S A 3947

N° d'ordre 4798

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Alice GOLDÉ née DUPUY

Première THESE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU VIRUS DU SARCOME DE ROUS

Deuxième THESE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

SOUTENUES LE 30 - 6 - 1962 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. LWOFF, Président

L'HÉRITIER
SCHAEFFER
} Examinateurs

IMPRIMERIE DES CÉLESTINS
6, QUAI DES CÉLESTINS - PARIS 4e
Tél. : ARC 38-27

N° d'ordre 4798

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Alice GOLDÉ née DUPUY

Première THESE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU VIRUS DU SARCOME DE ROUS

Deuxième THESE

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

SOUTENUES LE **1962 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN**

MM. LWOFF, Président

L'HÉRITIER
SCHAEFFER
} Examinateurs

FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

- PROFESSEURS -

Doyen ..... M. ZAMANSKY

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure
DE BROGLIE	T	Théories physiques
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées
GRASSE	T	Evolution des êtres organisés
PREVOST	T	Chimie organique
CHAUDRON	T	Chimie appliquée
WYART	T	Minéralogie et Cristal.
TEISSIER	T	Zoologie
MANGENOT	T	Biologie Vég. (Orsay)
AUGER	T	Physique quantique et Relativité
MONNIER	T	Physiologie Générale
PIVETEAU	T	Paléontologie
ROCARD	T	Physique (E.N.S.)
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.)
LAFFITTE	T	Chimie générale
FAVARD	T	Géométrie supérieure
COULOMB	T	Physique du Globe
Melle COUSIN	T	Biologie Animale (SPCN)
CHRETIEN	T	Chimie minérale
DRACH	T	Zoologie
KASTLER	T	Physique (E.N.S.)
EPHRUSSI	T	Génétique
RIVIERE	T	Géologie SPCN et sédim.
GAUTHERET	T	Biologie Vég. (P.C.B.)
LUCAS R.	T	Recherches Physiques
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire
ARNULF	T	Optique appliquée
MORAND	T	Physique Enseignement
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.)
FORTIER	T	Mécanique exp. des Fluides
DANJON	T	Astronomie
PETIT	T	Biologie maritime
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique
GALLIEN	T	Embryologie
EICHHORN	T	Botanique
DE CUGNAC	T	Biologie Végétale (SPCN)
Mle CAUCHOIS	T	Chimie Physique
THELLIER	T	Physique du Globe
L'HERITIER	T	Biologie Générale (Orsay)
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay)
PONCIN	T	Mécanique Générale
DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres
QUELET	T	Chimie Organique
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire
CUVILLIER	T	Micropaléontologie
JUNG	T	Pétrographie
TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique
WIEMANN	T	Chimie organique et struc.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et physique Céleste (Orsay)
VASSY	T	Physique de l'atmosphère
DESTOUCHES	T	Théories Physiques
AMIEL	T	Chimie générale
HOCART	T	Minéralogie et Cristallog.
J.P. MATHIEU	T	Physique (Optique)
COUTEAUX	T	Biologie animale (P.C.B.)
MAY	T	Zoologie (Orsay)
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie
FELDMANN	T	Biologie Végétale marine
GUINIER	T	Physique des Solides (Orsay)
JOST	T	Physiologie comparée
FORTET	T	Calcul des Probabilités et Physique mathématique
SCHWARTZ	T	Calcul diff. et Intégral
CHOUARD	T	Physiologie Végétale
MALAVARD	T	Aviation (Techn. Aéronaut.)
BRELOT	T	Calcul diff. et intégral
NORMANT	T	Synthèse organique générale
BENARD	T	Chimie Minérale
BUVAT	T	Botanique (E.N.S.)
DUGUE	T	Statistiques Mathématiques
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie
ULRICH	T	Physiologie Végétale
MARECHAL	T	Optique théorique et Appl.
KIRRMANN	T	Théories Chimiques
CHADEFAUD	T	Botanique
Mle LE BRETON	T	Physiologie de la nutri.
SALEM	T	Mathématiques générales
LELONG	T	Applic. de l'analyse à la géométrie
DEVILLERS	T	Anatomie et Histologie Comp.
EHRESMANN	T	Topologie Algébrique
FRANÇON	T	Physique (S.P.C.N.)
GLANGEAUD	T	Géographie phys. et Géologie dynamique
GODEMENT	T	Mathématiques (M.P.C.)
PISOT	T	Tech. Mathém. de la Phys.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538119_0032

ROCH	T	Géologie
SCHATZMAN	T	Astrophysique
TERMIER	T	Paléontologie stratig.
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales
LENNUIER	T	Physique (M.G.P.)
RIZET	T	Génétique (Orsay
ROUTHIER	T	Géologie appliquée
Mme TONNELAT	T	Physique Théorique
DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.)
SOUCHAY	T	Chimie générale
AIGRAIN	T	Electrotechnique générale
BRUSSET	T	Chimie systématique
M. LEVY	T	Physique théorique des Hautes Energies (Orsay)
Mme CHAIX	T	Chimie biologique
Mme HUREL-PY		Biologie Végétale (PCB)
PIAUX	T	Chimie (M.P.C.)
BRUN	T	Mécan. théorique des Fluides
LEDERER	T	Chimie biologique
Mme DUBREIL	T	Mathém. (Agrégation)
Mme LELONG	T	Mathématiques (E.N.S.)
BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.)
COTTE	T	Physique électricité
DUBOIS J.E.	T	Chimie organique
LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.)
MICHEL A.	T	Chimie Minérale (Orsay)
OLMER	T	Energétique générale
ROUAULT	T	Electricité (Orsay)
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée
BARCHEWITZ	T	Chimie Physique
BROSSEL	T	Physique atomique
BUSER	T	Physiologie comparée
CAMUS	T	Physiologie Vég. BMPV
CASTAING	T	Physique (Orsay)
CURIEN	T	Minéralo. et Cristallog.
MOYSE	T	Physiologie Végétale (Orsay)
NOIROT	T	Evolution des Etres Org.
PANNETIER	T	Chimie générale (Orsay)
POSSOMPES	T	Zoologie
PULLMANN	T	Chimie théorique
TEILLAC	T	Physique Nucl. et Radioactivité
TONNELAT	T	Biologie Physico-chim.
VILLE	T	Econométrie
WILLEMART	T	Chimie (P.C.B.)
DODE	T	Chimie (Orsay)
FREYMANN	T	Recherches Physiques
GUINOCHET	T	Biol. Vég. SPCN (Orsay)
ROLLET	T	Chimie (P.C.B.)
Melle JOSIEN	T	Chimie S.P.C.N.
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes
ARNOULT	T	Electronique (Orsay)
CHAPELLE	T	Physique (Orsay)
DELANGE	T	Mathématiques (Orsay)
DENY	T	Mathématiques Génér. (Orsay)
GERMAIN	T	Mécan. théor. des fluides
LUCAS G.	T	Géologie
ALLARD	T	Chimie Physique
BERTHELOT	T	Phys. Fondamentale des Hautes Energies (Orsay)
BRICART	T	Météorologie et Phys. de l'Atmosphère
Mme ALBE-FESSARD	T	Psychophysiologie
FRIEDEL	T	Physique des Solides (Ors)
M. JULIA		Etudes des Moléculaires naturelles complexes
LENDER	T	Biol. Animale (SPCN) (Orsay)
MAGAT		Physico-chimie des radioéléments
Melle QUINTIN	T	Electrochimie
MONOD	T	Chimie du métabolisme
BENOIT	T	Physiol. Anim. (Orsay)
DE POSSEL	T	Analyse numérique
CHARLOT	T	Chimie analytique
HAISSINSKY	T	Radiochimie
LEMEE	T	Physiol. Vég. BMPV (Orsay)
GUERIN	T	Chimie M.P.C. (Orsay)
CHATELET M.	T	Chimie (P.C.B.)
JEAN	T	Physique Nucléaire (Orsay)
MATTLER	T	Physique S.P.C.N.
MICHEL L.		Phys. Théor. des Hautes Energies (Orsay)
BERGERARD	T	Zoologie (Orsay)
BERTEIN	T	Electronique (Orsay)
BOUISSIERES		Chimie des Radioéléments (Orsay)
Mme COUTURE	T	Thermodynamique et Méc. physique
ELLENBERGER	T	Géologie appli. s/le terr.
FRANC		Biol. Animale (P.C.B.
SCHNELL		Botanique tropicale (Orsay)
STOLKOWSKI		Physiologie générale
ACHER		Chimie Biol. (Orsay)
BAUDOIN		Biologie animale P.C.B.
BEAUMONT		Biologie animale SPCN
BLAMONT	T	Géophysique Ionosphère
BOURREAU		Botanique
CURIE D.		Physique (M.G.P.)
DURAND-DELGA		Géologie
FREON	T	Chimie organique (Orsay)
HELLER	T	Physiologie végétale
TORTRAT	T	Calcul des Probabilités
CAILLEUX		Géologie (S.P.C.N.)
MAGNAN	T	Physique (S.P.C.N.)
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire appl. à la Chimie Théor. et à la Physique Nucléaire
Mle FOURCROY		Biol. Végétale (S.P.C.N.)
Mme CHOQUET-BRUHAT	T	Méc. Analytique et Méc. céleste
Melle Veil		Physiologie Générale
LWOFF	T	Microbiologie
SIESTRUNCK	T	Mécan. Phys. et Expérim.
LACOMBE	T	Métallur. des métaux Nucl.
BROCHARD	T	Physique P.C.B. (Orsay)
CABANNES	T	Mécanique générale
LESIEUR	T	Mathématiques MPC (Orsay)
MAZET	T	Mécanique générale (Orsay)
CAIRE		Géographie phys. et Géol. Dynamique
COMOLET	T	Mécanique des Fluides
CORABOEUF		Physiologie Animale
DELLOUE		Physique de l'exosphère
GORENFLOT		Botanique II (Orsay)
HOUILLON		Biologie Animale P.C.B.
JULLIEN J.		Chimie P.C.B.
MALGRANGE	T	Tech. Math. de la Phys.
OLIVIER		Antropologie
NOZERAN	T	Botanique II (Orsay)
BLANC-LAPIERRE		Physique ENS. (Orsay)
CHEVAUGEON	T	Botanique (Orsay)
KAHANE	T	Mathématiques (Orsay)
SAMUEL	T	Mathématiques E.N.S. féminines
KOURGANOFF	T	Astronomie (Orsay)
THIRY	T	Mécanique céleste

SECRETAIRE GENERAL ..... R. POULLAIN.

A ma Mère

A mon Mari

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Docteur LATARJET, Directeur de l'Institut du Radium, qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire. Ses suggestions et son intérêt bienveillant m'ont aidé dans la poursuite et l'achèvement de ce travail. Je le prie de trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Monsieur le Professeur A. LWOFF a bien voulu s'intéresser à mes recherches; ses critiques et ses conseils m'ont été particulièrement précieux. Je suis heureuse de lui exprimer ici toute ma reconnaissance.

Je tiens également à dire tout ce que je dois à Monsieur le Docteur P. VIGIER, Maître de Recherches au C.N.R.S. J'ai tiré le plus grand profit des discussions nombreuses et amicales que j'ai eues avec lui. Ses conseils ont été pour moi les meilleurs des encouragements.

Enfin, Madame J. VILLAUDY et Mademoiselle J. CROCHET m'ont apporté pendant l'accomplissement des expériences une collaboration technique très efficace. Je tiens à leur adresser mes remerciements.

CARACTÉRISTIQUES DES PRINCIPAUX VIRUS ONCOGÈNES ÉTUDIÉS ACTUELLEMENT

Nature des Tumeurs produites	Année de la découverte	Mise en évidence du virus	Animaux sensibles	Mode de transmission
Virus aviaires				
leucémies (érythro-myéloblastose)	Ellerman et Bang 1908	par inoculation d'extraits acellulaires de tissus cancéreux		contagion
Sarcome n° 1	Rous 1911		Poule	contagion
Lymphomatose	Burmester et col. 1946			contagion et transmission par l'oeuf
Virus de mammifères lapin				
fibrome *	Shope 1932	par inoculation d'extraits acellulaires de tumeurs	lapin sauvage lapin domestique	contagion
papillome	Shope 1933			
↓ carcinome	Rous et Beard 1935			

* Le fibrome est la seule tumeur bénigne qui figure dans ce tableau.

Nature des Tumeurs produites	Année de la découverte	Mise en évidence du virus	Animaux sensibles	Mode de transmission
<u>Virus de mammifères Souris</u> épithéliome mammaire	Bittner 1936	par allaitement	souriceau nouveau-né	transmission par le lait, le sperme
leucémie lymphoïde	Gross 1951 Gross 1959	par inoculation d'extraits d'organes leucémiques. par irradiation des souris aux rayons X.	souris	transmission par l'oeuf
hyperplasie réticulaire	Friend 1957	par inoculation d'extraits acellulaires de carcinome d'Ehrlich de la souris.	souris	-
leucémie myéloïde	Graffi 1957	comme ci-dessus	souris	-
Tumeur parotidienne et Tumeurs multiples (virus du polyome)	Gross 1953 Stewart et Eddy 1959	par inoculation d'extraits acellulaires d'organes normaux ou leucémiques. par infection de cultures de cellules de souris ou de singe à l'aide d'extraits acellulaires d'organes leucémiques.	souris rats lapin nouveau né hamster	contagion

I N T R O D U C T I O N

Le virus de Rous est le premier virus cancérigène dont la présence fut démontrée en 1911 dans une tumeur spontanée de la poule. Trois ans avant sa découverte, Ellerman et Bang (1908) avaient bien constaté que le plasma acellulaire de poules leucémiques contenait un agent infectieux de nature virale, mais le caractère néoplasique de la maladie n'était pas encore déterminé, et c'est en fait Rous qui démontra pour la première fois que l'extrait acellulaire d'un sarcome aviaire reproduisait la tumeur quelques jours après son inoculation dans le muscle d'une poule saine. L'assimilation de l'agent tumorigène présent dans les extraits, au groupe des "virus" découverts 13 ans auparavant (Beijerinck 1898, Loeffler et Frosh 1898, Sanarelli 1898) fut faite d'après la seule propriété permettant à cette époque de distinguer les virus des bactéries, et qui était la filtrabilité à travers les bougies stérilisantes. Depuis lors, le terme de "virus" a pris une signification précise, qui implique l'existence d'un ensemble de propriétés (Lwoff 1954) que nous aurons l'occasion de décrire au cours des chapitres suivants. La découverte de Rous incita de nombreux pathologistes à rechercher la présence de virus dans des tumeurs bénignes ou malignes apparues spontanément chez différentes espèces animales; ces recherches aboutirent effectivement à l'identification de plusieurs virus oncogènes, dont les principaux connus

à ce jour, figurent dans le tableau ci-joint ; on peut voir que certains d'entre eux, en particulier les virus leucémogènes et le virus du polyome de la souris, n'ont été découverts que très récemment.

Pendant 40 ans, bien que la production des tumeurs par les virus cancérigènes ait fait l'objet de nombreuses études *in vivo*, peu de progrès furent réalisés en ce qui concerne le mode d'action de ces virus sur les cellules. En effet, comme le rappelait Rous en 1943, ce problème ne doit être posé qu'à l'échelon cellulaire, hors de l'organisme animal, où de nombreux facteurs, tels que la constitution génétique, les hormones, les réactions immunitaires, modifient le développement des tumeurs, rendant difficile sinon impossible l'interprétation des résultats. Quant aux expériences de cancérisation des cellules normales sous l'action d'un virus *in vitro*, réussies pour la première fois en 1925 par Carrel, elles ne constituèrent qu'une amélioration très relative par rapport aux expériences effectuées chez les animaux, étant donné que les méthodes de culture de fragments de tissus employées, dérivées de la méthode de Harrison (1907) et Carrel (1912), ne permettaient de connaître ni le nombre des cellules infectées, ni la quantité de virus ayant pénétré dans les cellules. Ce n'est qu'en 1952 que l'étude des virus, y compris les virus cancérigènes, entra dans une voie nouvelle. A cette date, en effet, Dulbecco mit au point des méthodes quantitatives de culture des cellules et de titrage des virus animaux *in vitro* comparables à celles utilisées depuis longtemps par les bactériologistes pour étudier la croissance des bactéries et des bactériophages. Cet auteur démontra que la digestion trypsique d'embryons

de poule permet d'obtenir une suspension de cellules isolées, faciles à compter et qui, ensemencées directement sur le verre, forment une couche mono-cellulaire sensible à l'action d'un virus. Etant donné que le virus étudié (encéphalite équine) était cytodestructeur, c'est-à-dire détruisait les cellules dans lesquelles il se multipliait, Dulbecco mit au point une méthode directe de numération des particules infectieuses par les plages de lyse formées dans la couche de cellules, et effectua la première étude cinétique quantitative in vitro de la multiplication d'un virus animal. Depuis cette époque, la multiplication d'un grand nombre de virus animaux a été étudiée (voir Isaacs 1959) dont trois seulement sont des virus oncogènes ; l'un est le virus du fibrome de Shope, tumeur bénigne du lapin; les deux autres sont des virus cancérigènes, le virus du polyome de la souris et le virus de Rous qui fait l'objet du présent travail. Dans l'ensemble, les résultats obtenus confirmèrent et précisèrent ce que des études effectuées in vivo, dans l'oeuf embryonné de poule (Henle et coll. 1947-1949. Hoyle 1948) avaient montré, et que l'on peut résumer brièvement de la façon suivante :

Quand on met une cellule en présence d'une suspension d'un virus spécifique de l'espèce animale à laquelle appartient cette cellule, les particules se fixent sur les récepteurs spécifiques de la membrane cellulaire, où elles sont encore accessibles à l'action neutralisante des anticorps. Cette adsorption est suivie de la pénétration du matériel viral dans la cellule et après un temps variable suivant le virus considéré, aucune particule infectieuse ne peut plus être extraite. C'est la <u>période d'éclipse</u>, pendant laquelle le nouveau matériel

viral est synthétisé soit dans le noyau cellulaire, soit dans le cytoplasme, soit dans les deux. Après un temps variable suivant le virus étudié, survient la période de maturation qui correspond au rassemblement des différents constituants synthétisés durant la période d'éclipse en un site de la cellule où les nouvelles particules ainsi formées sont morphologiquement identifiables. Celles-ci sont ensuite libérées de la cellule en quantités croissantes, et dans la majorité des cas, la cellule infectée est détruite. Dans quelques cas, notamment, parmi les virus cancérigènes, celui du virus de Rous, sans doute le mieux connu, la cellule continue à se multiplier et à produire de petites quantités de virus, les cellules filles conservant en général cette propriété sans requérir aucune réinfection.

A côté des travaux de Dulbecco, une autre découverte fondamentale permit de préciser nos connaissances sur les propriétés biologiques des virus, qu'il s'agisse de virus bactériens, végétaux ou animaux. Il y a 10 ans, différentes observations (Hershey et coll. 1952, 1953, 1954) suggéraient bien que l'acide nucléique contenu dans la particule virale infectante doit jouer un rôle essentiel dans l'initiation de l'infection et la production de nouvelles particules, mais la preuve directe n'en fut donnée qu'en 1956 par Gierer et Schramm, d'une part, et Fraenkel-Conrat, d'autre part; ces auteurs démontrèrent que l'on peut extraire l'acide nucléique du virus de la mosaïque du tabac sous une forme telle qu'il peut infecter des feuilles de tabac saines et provoquer la synthèse et la libération de nouvelles particules infectieuses. Leur méthode d'extraction fut appliquée avec succès à l'isolement des acides

nucléiques infectieux, ARN (acide ribonucléique), ou ADN (acide désoxyribonucléique), d'un certain nombre de virus non oncogènes et oncogènes (voir Herriott 1961). Cette découverte, en même temps qu'elle a prouvé que l'acide nucléique viral contient toute l'information génétique nécessaire à sa propre réplication et à la synthèse des protéines spécifiques des nouvelles particules, a ouvert la voie à des études biochimiques fondamentales, au cours desquelles il est possible d'agir sur la multiplication du virus en incorporant des bases et des amino-acides anormaux dans les acides nucléiques et les protéines cellulaires et virales. Nous avons orienté nos propres recherches dans ce sens après avoir défini les caractéristiques de la multiplication du virus et des cellules de Rous cultivées selon la méthode de Dulbecco.

HISTORIQUE DU VIRUS DE ROUS

Le virus de Rous fait partie du groupe des virus cancérigènes aviaires, qui comprend des virus sarcomatogènes (Rous 1936) et leucémogènes, comme les virus de l'érythro-myéloblastose (Ellerman et Bang, 1908 - Ellerman, 1921 - Engelbreth-Holm 1942) et de la lymphomatose (Burmester, Prickett et Belding 1946).

Les réactions immunologiques croisées qui se produisent entre ces différents virus suggèrent qu'ils ont un antigène commun (Oberling et Guérin 1954 - Beard 1957) ; ce fait, compte tenu de leur contagiosité (Burmester et Fontes 1960), oblige les expérimentateurs qui étudient l'un ou l'autre d'entre eux à vérifier que les poules, les embryons ou les oeufs à inoculer sont dépourvus d'anticorps antiviraux provenant d'une contamination accidentelle, notamment par le virus de la lymphomatose, très contagieux (Burmester et Gentry 1954) et souvent présent dans les élevages de poules (Duran-Reynals, Burmester, Cottral et Bryan 1953). Parmi ces virus, le virus du sarcome n° 1 a conservé depuis sa découverte une place privilégiée en raison d'une de ses propriétés qui est essentielle du point de vue pratique, pour tout ce qui concerne les recherches chez l'animal; il provoque localement une tumeur visible quelques jours après son inoculation sous la peau, dans le derme ou dans le muscle de la poule.

I - Le virus de Rous chez l'animal

L'hôte naturel du virus de Rous est la poule. Cependant, les différentes souches de poules (Waters, 1945-1957 - Greenwood, Blyth et Carr 1948) peuvent présenter entre elles de grandes différences de sensibilité, puisque celle-ci peut varier d'un facteur de 1 à 10.000 entre une souche sensible et une souche résistante (Bryan 1957). On doit à Carr (1943-1953) d'avoir attiré le premier l'attention sur cet important facteur qui est lié à la constitution génétique de l'animal, et ne semble dépendre que d'un seul gène (Waters et Burmester 1961). Parmi les souches sélectionnées, la souche Leghorn blanche est une des plus sensibles (Prince, 1958), c'est pourquoi tous les oeufs et tous les embryons que nous avons utilisés proviennent d'un élevage de poules de cette souche. Il est vraisemblable que l'ignorance du rôle de la constitution génétique sur la sensibilité des poules au virus de Rous est en grande partie responsable de l'hétérogénéité des résultats obtenus par les premiers expérimentateurs (Rous et Murphy 1914 - Gye et Andrewes 1926 - Gye et Purdy 1931).

La spécificité du virus de Rous n'est pas aussi stricte que celle de certains virus oncogènes, comme le virus du fibrome de Shope du lapin, ou comme la plupart des virus leucémogènes de la souris, car il peut s'adapter à des hôtes hétérologues assez voisins, tels que le dindon, le canard (Gye et Purdy 1931), le faisan (Andrewes 1932) ou très différents comme le rat embryonnaire (Zilber et Kryukova, 1957) ou nouveau-né (Svoboda et Grozdnovic 1959 - Svoboda 1960). Duran-Reynals (1946) a étudié particulièrement l'influence de l'âge de l'animal hétérolo-

logue inoculé (dindon-canard) sur l'adaptabilité de ce virus et il a démontré que les conditions optimum sont réalisées quand on inocule un extrait d'une tumeur de poule adulte à un animal hétérologue nouveau-né.

Les cellules les plus sensibles à l'infection sont les cellules d'origine mésodermique (Foulds (1934 - Duran-Reynals 1953). Les tumeurs, visibles à partir du 4e jour (Bryan 1946) après l'inoculation du virus dans le muscle, dans le derme ou sous la peau de la poule, sont formées de cellules macrophagiques et fibroblastiques (Woll 1948); elles sont riches en substance mucoïde et sont métastasantes comme beaucoup de cancers (Freire et Duran-Reynals 1953). L'emploi d'une souche ascitique a permis à Epstein (1951) Bather (1954 a - b) et Ponten (1956) de définir certaines caractéristiques des cellules et du virus de Rous, mais en dépit de l'amélioration que cela représentait par rapport à la tumeur solide, la technique utilisée par ces auteurs restait trop imprécise pour que les résultats fussent interprétés quantitativement. La spécificité tissulaire du virus de Rous n'est pas plus étroite que sa spécificité d'espèce ; en dehors des cellules mésodermiques, il peut en effet se multiplier dans des cellules d'origines différentes, ce qui a été utilisé pour mettre au point plusieurs méthodes de titrage. La plus importante et la plus précise de ces méthodes est basée sur la propriété du virus à infecter les cellules ectodermiques de la chorio-allantoïde d'oeufs de poule embryonnés, provoquant le développement de tumeurs (Rous et Murphy 1911) ou de micro-tumeurs ou "pocks" (Keogh 1938 - Rubin 1955) faciles à compter. D'autre part, lorsque le virus de Rous se multiplie dans les parois des vaisseaux de l'embryon (Milford et Duran-

Reynals, 1943) ou du poussin (Duran-Reynals, 1943), il produit une maladie hémorragique mortelle, non accompagnée de tumeurs dans les embryons. Enfin, Ephrussi et Temin (1960) ont démontré que les cellules de l'épithélium iridien de poulet sont sensibles à l'infection par le virus de Rous.

Ce que l'on a dit précédemment à propos de la maladie hémorragique produite chez l'embryon et le poussin montre que l'âge joue un rôle important dans la nature de la réponse de l'animal à l'infection (Duran-Reynals, 1946), ce qui constitue une analogie entre virus cancérigènes et non cancérigènes. Il semble que le facteur âge soit en rapport avec l'état hormonal de l'animal, au moment de l'inoculation, problème qui a été très peu étudié en ce qui concerne le virus de Rous (Groupé et coll. 1956). Pour celui-ci l'âge joue de plus un rôle important en rapport avec le danger de contamination des animaux par le virus de la lymphomatose qui, nous l'avons déjà dit, provoque la formation d'anticorps neutralisant le virus de Rous; plus l'animal est jeune, moins il a de risques d'être contaminé. C'est pourquoi plusieurs expérimentateurs n'effectuent leurs expériences in vivo que sur des poussins nouveau-nés. Cependant, l'âge le plus favorable paraît être de 5 à 6 semaines, quand les anticorps maternels ont disparu et que de nouveaux anticorps n'ont pu encore se reformer (Dougherty, Stewart et Morgan, 1960). La connaissance de l'influence de ces différents facteurs, constitution génétique, âge, anticorps, sur la sensibilité des animaux, a permis de mettre au point des méthodes de titrages in vivo effectuées dans des conditions optimum et que nous décrirons brièvement dans un des paragraphes suivants.

II - Caractères des tumeurs in vivo

Les tumeurs se développent soit après l'inoculation d'extraits acellulaires de tumeurs, donc de virus, soit après l'inoculation de cellules sarcomateuses, ce qui correspond à deux modes distincts du développement tumoral; dans le premier cas, le virus infecte et cancérise les cellules saines du tissu inoculé, dans le second cas, la tumeur semble provenir essentiellement de la greffe et de la multiplication des cellules inoculées (Duran-Reynals et Freire, 1953). Ce dernier fait ne peut être démontré qu'en inoculant les cellules sarcomateuses chez un animal immun vis-à-vis du virus; dans ces conditions, le virus est neutralisé dès qu'il est libéré par les cellules, et la tumeur qui se développe ne peut résulter que de la greffe et de la multiplication des cellules inoculées. Comme on le verra dans le chapitre II, c'est l'emploi de cette technique qui a permis de prouver que les cellules normales converties morphologiquement in vitro par le virus sont effectivement néoplasiques. Ce double mécanisme du développement des tumeurs peut expliquer certaines particularités qui furent observées dès le début des recherches effectuées chez l'animal. En effet, le fait que certaines tumeurs peuvent régresser et réapparaître après plusieurs mois (Carr 1942) au point d'inoculation, même en présence d'un taux d'anticorps élevé (Freire et coll. 1953) peut s'expliquer par la persistance d'un groupe de cellules néoplasiques qui, pour une raison inconnue, recommencent à proliférer. De plus, on sait depuis fort longtemps (Rous 1914 - Andrewes 1939) que la production d'anticorps anti-virus de Rous au cours du développement de la

tumeur n'agit pas sur la vitesse de croissance de cette dernière, qui est la même quelle que soit sa richesse en virus. Par conséquent, la résistance à l'infection par le virus est distincte de la résistance à la greffe des cellules, ce qui a été démontré par Rubin (1956) Prince (1959), Dougherty, Stewart et Morgan (1960).

Richesse en virus et nombre des cellules productrices de virus dans les tumeurs

De la quantité de virus inoculée dépend d'une part, la richesse en virus de la tumeur (Bryan 1955 - Haguenau et coll. 1958), ce qui a permis de mettre au point une méthode de titrage chez l'animal, d'autre part le nombre des cellules produisant le virus ou centres infectieux. Ces dernières cependant ne constituent qu'une fraction de la population cellulaire totale (Rubin 1955 - Edlinger 1958 - Prince 1959 - Vigier et Goldé 1961) puisqu'on ne détecte qu'un centre infectieux pour 2 à 17 cellules dans les meilleures conditions, aux plus fortes concentrations de l'inoculum. Deux hypothèses ont été suggérées pour expliquer cette particularité : ou bien, comme l'a écrit Rubin en 1955, toutes les cellules produisent du virus, mais certaines d'entre elles le produiraient trop lentement pour être détectables dans les limites de temps de la méthode de titrage utilisée, ou bien les cellules non détectées comme centres infectieux sont néoplasiques et non productrices de virus. Jusqu'à ces dernières années la seconde hypothèse semblait peu vraisemblable, car on considérait (Rubin 1955 -

Bryan 1957) que la présence du virus de Rous sous sa forme infectieuse était nécessaire à la transmission de la malignité au cours de la multiplication des cellules infectées. Or, des résultats récents obtenus in vivo et in vitro (voir chapitre III) suggèrent que le caractère néoplasique et la production du virus infectieux peuvent être dissociés. En ce qui concerne les résultats obtenus in vivo , dès le début des recherches sur le virus de Rous, différents expérimentateurs avaient observé que certains sarcomes étaient dépourvus de virus et devenaient non filtrables, ce qui avait conduit Duran-Reynals (1953), Oberling et Guérin (1954) à suggérer que le virus de Rous peut devenir "masqué", c'est-à-dire peut passer sous une forme non infectieuse dans les cellules infectées. Cependant, étant donné qu'à cette époque, la plupart des expériences étaient effectuées sur des animaux non sélectionnés, hétérogènes, de sensibilité très variable, cette disparition du virus pouvait n'être qu'apparente et résulter de mauvaises conditions expérimentales (Bryan 1957). Par contre, cette explication n'est pas valable dans le cas des expériences de Prince (1958-1959) qui a utilisé des animaux sensibles, non contaminés par le virus de la lymphomatose. Cet auteur, inoculant des doses de virus inférieures à la DT_{50} (voir paragraphe suivant) chez de jeunes poulets, a obtenu, comme Bryan, Calnan et Moloney (1955) des tumeurs sans virus. Cette absence de virus ne semble pas provenir de sa neutralisation par des anticorps contenus dans l'extrait tumoral, car des tumeurs avec et sans virus, initiées par une même dose, peuvent se développer côte à côte sur un même animal, donc en présence des mêmes facteurs hormonaux et immunitaires.

D'autre part, si les anticorps étaient responsables de ce phénomène, la mise en culture des cellules de tumeurs dépourvues de virus devrait s'accompagner de la réapparition de particules infectieuses dans le milieu nutritif (Bergs et Groupé 1961). Or ce n'est pas le cas, et un certain nombre de groupes de cellules tumorales isolées par Prince restent non productrices de virus *in vitro*. Cette absence de particules infectieuses semblent donc correspondre à une interaction spéciale de la cellule et du virus dont on discutera dans la dernière partie de ce travail, Groupé et Rauscher (1959) ont également provoqué le développement de tumeurs sans virus chez des dindons nouveau-nés et l'on verra, dans le chapitre III, que l'infection des cellules de poule *in vitro* peut conduire au même résultat (Prince 1960 - Temin 1962 - exp. non publiées). Ces faits suggèrent que le virus de Rous peut convertir des cellules normales en cellules néoplasiques sans que la conversion s'accompagne obligatoirement de la production de particules infectieuses (chapitre VI).

III - Méthodes de titrages

Durant les trente années qui ont suivi sa découverte, le virus de Rous ne fut étudié que qualitativement, aucune méthode d'évaluation de la concentration des extraits tumoraux n'ayant été mise au point. La première mesure du pouvoir cancérigène d'un filtrat acellulaire de sarcome ne fut faite qu'en 1939, par Amies et Carr et en 1940, par Claude et Rothen, qui inoculèrent par voie sous-cutanée (Rous 1913) des séries de dilutions chez un même animal, leur permettant ainsi de déter-

miner une dose minimum infectieuse. Cependant la variabilité des résultats était très grande, c'est pourquoi Carr et Harris (1951), Kenzy (1952) tentèrent d'améliorer la technique en inoculant des séries de dilutions virales par voie sous-cutanée à des poussïns, à raison d'une seule inoculation par poussin. C'est dans ces conditions que Bryan (1946-1956) a mis au point une méthode de titrage quantitative suffisamment précise pour que les résultats soient soumis à une analyse statistique (Bryan 1957). Les observations de Bryan peuvent être résumées brièvement en disant que le temps de latence, l'incidence tumorale, la richesse en virus des tumeurs dépendent de la quantité de virus inoculée ; en particulier, le titrage est basé sur le fait qu'il existe une corrélation quantitative entre le pourcentage d'animaux ayant une tumeur et la concentration de l'inoculum. Les résultats sont calculés d'après la méthode de Reed et Muench (1936) et exprimés en nombre de doses tumorigènes (DT 50) présentes dans 1 ml de suspension virale, chaque DT 50 correspondant au log. de la concentration de l'extrait tumoral qui provoque l'apparition d'une tumeur dans 50% des animaux inoculés. D'autres méthodes de titrages in vivo ont été mises au point en inoculant des dilutions de l'extrait tumoral dans l'embryon (Lo et Bang 1955 - Borsos et Bang 1957) ou dans le cerveau de poussins nouveau-nés (Groupé et coll. 1957), mais elles sont assez délicates et les résultats obtenus ne sont pas plus précis que ceux de Bryan. Actuellement, toutes les méthodes de titrages chez l'animal sont supplantées par la numération directe des particules virales soit par inoculation sur la chorio-allantoïde d'oeufs embryonnés, méthode mise au point par Rubin (1955), soit par inoculation

sur des couches monocellulaires de fibroblastes, méthode adaptée de celle de Dulbecco par Rubin et Temin (1958). On reviendra en détails sur ces deux techniques au cours de l'exposé des méthodes expérimentales (chapitre I).

IV - Caractéristiques physico-chimiques et morphologiques du virus :

1/ Propriétés physico-chimiques

Nous les résumerons rapidement car elles ont été décrites en détails par Bryan (1955).

La sensibilité thermique du virus de Rous fut observée très tôt (Gye et Purdy 1931) et son temps d'inactivation thermique (chapitre II) à 37°, température d'incubation des cultures, doit être expérimentalement déterminé afin d'introduire un facteur correctif dans les calculs du rendement en virus par cellule (Rubin 1955). La richesse en protéines et le pH du tampon utilisé pour préparer la suspension virale (Bryan, Maver et Moloney 1950) ont aussi une grande influence sur la stabilité du pouvoir infectieux du virus ; c'est pourquoi toutes les suspensions sont faites à pH 7,1 - 7,2 dans un tampon phosphate, en présence de 10 à 20% de sérum de veau. Les souches de virus standard doivent être conservées à -70° dans des ampoules scellées maintenues dans des blocs de carboglace (Bryan, Moloney et Calnan 1954), car même à -20°, le virus s'inactive notablement en quelques semaines.

Les premières tentatives de purification furent effectuées en 1935 par Mac Intosch, et en 1937 d'une part par Claude, d'autre part

par Amies, qui sédimentèrent le virus avec la fraction microsomiale des extraits de tumeurs par centrifugation de ceux-ci à grande vitesse. Cette technique donnant des suspensions virales très impures, plusieurs expérimentateurs essayèrent de la perfectionner en y associant des digestions enzymatiques des extraits (Amies et Carr 1939) ou la précipitation par la protamine (Moloney 1956). En dépit de cela, l'examen des culots de centrifugation au microscope électronique montrait que la quantité d'impuretés d'origine cellulaire restait très importante; l'emploi du fluorocarbone permit à Epstein et Holt (1958) d'obtenir des suspensions de particules virales d'aspect homogène pratiquement dépourvues d'impuretés, mais l'inactivation importante du virus qui se produit au cours de la préparation limite l'emploi de cette technique aux études uniquement morphologiques. Ce n'est que très récemment en 1960, que Crawford purifia de façon satisfaisante le virus de Rous en lui conservant son activité biologique, grâce à l'utilisation de la méthode de centrifugation en gradients de densité de Meselson, Stahl et Vinograd (1957).

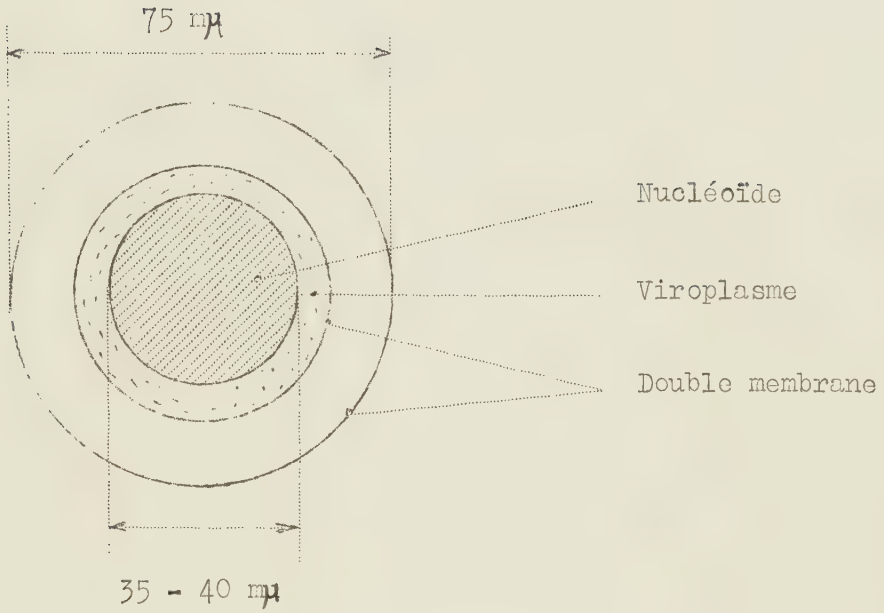
2/ Taille et structure des particules

Dès 1935, Elford et Andrewes démontrèrent, par la méthode de filtration sur membrane de collodion, que la taille de la particule infectieuse est comprise entre 70 et 80 mμ. Il fallut attendre l'avènement du microscope électronique pour que, 12 ans plus tard, en 1947, Claude, Porter et Pickels observent des particules denses de cette dimension dans des coupes de tumeurs. Cependant, ce n'est qu'en 1956 que Epstein (cellules d'ascite) et en 1958, Haguenau, Dalton et Moloney

(coupes de tumeurs) confirmèrent que ces particules représentaient bien le virus de Rous en démontrant l'existence d'une corrélation entre leur nombre et la concentration en virus de l'extrait effectué à partir de la même tumeur que celle sur laquelle portait l'observation microscopique. On verra dans le chapitre II, que les particules complètes douées du pouvoir infectieux ne se trouvent qu'à l'extérieur des cellules, ou dans des vacuoles cytoplasmiques de pynocytose.

Chaque virus mûr se présente sous la forme d'une particule sphérique de 75 mμ de diamètre comportant un nucléoïde central dense, de 35 à 40 mμ de diamètre, un viroplasme protéique et une double membrane. Les examens morphologiques associés aux digestions enzymatiques (ribonucléase) ont conduit Epstein et Holt (1958) à suggérer que le nucléoïde est formé d'un acide ribonucléique. Ce fait a été confirmé par l'analyse chimique directe des particules purifiées (Crawford 1960) et comme on le verra au cours du chapitre IV, par l'emploi des inhibiteurs spécifiques de la synthèse des acides nucléiques (Goldé et Vigier 1961).

Le poids moléculaire de cet ARN est de $9,5.10^6$ d'après Crawford (1961). Il semble que les particules infectieuses contiennent des lipo-protéines, étant donné qu'elles sont inactivées par la digestion à l'aide de la phospholipase (Drayton 1961). Ce fait peut expliquer la faible densité du virus de Rous qui est de 1,15 d'après Kahler, Bryan, Lloyd et Moloney (1954) et de 1,16 à 1,19 d'après Crawford (1960).



Les expériences dont il est question dans le présent travail ont été entreprises en 1957, et concernent l'étude des caractéristiques biologiques et biochimiques du virus et des cellules de Rous in vitro . Après avoir décrit les méthodes expérimentales (chapitre I), on étudie les périodes de la multiplication du virus et des cellules dans des conditions de cultures différentes dérivées de la méthode de Dulbecco, avec une analyse parallèle des modifications morphologiques subies par les cellules infectées (chapitres II et III).

Les deux chapitres suivants sont consacrés à différentes recherches biochimiques : dans le chapitre IV, on étudie la cinétique de la synthèse du matériel viral en incorporant, au cours de la multiplication du virus, des bases anormales (5 fluoro-uracile, 5 fluoro desoxyuridine) et un amino-acide anormal (5 fluoro-phénylalanine) dans les cellules infectées ; dans le chapitre V, on détermine quantitativement les modifications des acides nucléiques, des nucléotides

acido-solubles, des protéines produites par le virus à différents moments de son cycle de multiplication dans les cellules infectées.

Le VIe et dernier chapitre est une discussion d'ensemble des résultats et des différents problèmes qu'ils soulèvent.

CHAPITRE PREMIER

METHODES EXPERIMENTALES

Comme nous l'avons déjà signalé dans l'historique du virus de Rous, tous les oeufs utilisés, soit pour les titrages, soit pour préparer les cultures de fibroblastes, proviennent d'une souche de poules Leghorn blanches d'un même élevage à faible incidence de lymphomatose (1%).

I - Cultures cellulaires

Elles sont effectuées d'après la méthode de Dulbecco (1952).

1/ - Mode de préparation de la suspension de cellules isolées

Pour chaque série d'expériences, deux embryons âgés de 8 à 10 jours sont prélevés aseptiquement, lavés dans une solution de tampon phosphate (PBS) (Dulbecco et Vogt 1954) découpés en fragments et mis à digérer au bain-marie à 37° en milieu agité, dans 20 ml de trypsine à 0,25% dans du PBS^{+} + 2 mg pour 100 ml d'hyaluronidase. Après 20 min. de digestion, on neutralise l'action de la trypsine en ajoutant 20% de sérum de veau à la suspension, et on centrifuge à 1.500tm/5 min.

On resuspend le culot cellulaire dans un volume déterminé de milieu nutritif, on homogénéise en pipettant plusieurs fois de suite, et on compte les cellules à l'hématimètre de Thoma. On obtient en moyenne 100 à 150 millions de cellules par embryon de 9 jours.

2/ - Modes de cultures

a) Cultures primaires

Ce sont les cultures constituées par les cellules de l'embryon. En dehors des premières expériences où elles ont été infectées pour y suivre la multiplication du virus (Chapitre II), elles n'ont été utilisées que comme matériel de départ destiné à être repiqué pour former les cultures secondaires.

Les cultures primaires s'obtiennent en ensemençant 40 ml, ou 60 ml, de suspension de cellules embryonnaires contenant 500.000 à 700.000 cellules/ml, dans des flacons de Roux à faces planes, d'une capacité de 600 ml. ou 1.000 ml.

b) Cultures secondaires

Elles constituent le matériel utilisé pour effectuer la majorité de nos expériences. Trois jours après la mise en culture, les cellules des cultures primaires sont confluentes et ne se multiplient pratiquement plus. On les détache du verre en faisant agir une solution de trypsine à 0,05 % pendant 10 à 15 min. à 37°. On prélève la suspension cellulaire et on la centrifuge après avoir neutralisé l'action de la trypsine par addition de 20% de sérum de veau. On compte ensuite les cellules, et on ensemence le volume désiré d'une suspension contenant en moyenne 70.000 à 100.000 cellules par ml, dans les récipients choisis pour

effectuer l'expérience. A partir du chapitre III, toutes les expériences ont été faites sur des cultures de cellules infectées 24 heures après repiquage dans les conditions définies ci-dessus. A ce moment, les cellules forment une couche monocellulaire non confluente et se multiplient activement pendant 4 à 5 jours, ce qui correspond en moyenne à la durée d'une expérience.

L'arrêt des cultures se fait dans les mêmes conditions que le repiquage quand il s'agit d'apprécier la multiplication cellulaire; quand on veut titrer les cellules productrices de virus par inoculation sur la chorio-allantoïde (voir plus loin), on doit réaliser certaines conditions qui seront décrites lors de l'exposé des expériences dans les chapitres II et III.

3/ Conditions de cultures

a) Récipients utilisés.

Suivant le type d'expériences à effectuer, ils comprennent :

- des flacons de Carrel, de 33 mm de diamètre, contenant 1 ml. de milieu.

- des bouteilles de verre neutre de 250 ml, de 120 mm sur 50 mm, à faces planes, contenant 15 ml de milieu.

- des flacons de Roux en pyrex, de 600 ml et 1000 ml, contenant respectivement 40 et 60 ml de milieu.

- des tubes de pyrex spéciaux que nous décrirons à propos des études cytochimiques.

Tous sont bouchés hermétiquement avec des bouchons de caoutchouc siliconés.

- des boites de Pétri en pyrex de 60 mm de diamètre, contenant 6 ml. de milieu.

b) Milieux utilisés

Solutions physiologiques

- Tampon phosphate (PBS, Dulbecco et Vogt 1954) d'un pH de 7,2. Dans certaines manipulations, on utilise le PBS⁻, c'est-à-dire sans Ca ni Mg, ce qui diminue l'agrégation cellulaire dans la suspension.

- la solution d'Earle (Perry, Evans et Earle, 1955) d'un pH de 7,3 qui nous est fournie par l'Institut Pasteur.

Antibiotiques

Pénicilline = 300.000 unités dans 100 ml de PBS.

Streptomycine = 3 g. pour 100 ml de PBS.

Milieu synthétique

Il comprend le milieu "M 199" que Morgan et Morton (1958) ont mis au point sur des fibroblastes de coeur embryonnaire de poulet, fourni par l'Institut Pasteur, et que nous complétons en lui ajoutant 0,5% de milieu synthétique de Fischer (1953). Le rouge de phénol qu'il contient permet de suivre les variations de pH du milieu nutritif.

Milieux de culture

Ils sont très riches en protéines, car le milieu synthétique

seul ne permet pas d'obtenir une croissance des cellules de poulet. L'apport protéique est constitué par du sérum de veau embryonnaire ou adulte et de l'extrait embryonnaire de veau. Ce dernier est obtenu en faisant incuber durant une nuit 500 g. de pulpe d'embryons de veau éviscérés de 2 mois, dans 500 ml de milieu d'Earle, puis en centrifugeant afin d'éliminer les débris. Le surnageant de la centrifugation contient les facteurs de croissance (voir Morgan 1958) nécessaires à une bonne multiplication des cellules.

Milieu utilisé pour la mise en culture et les repiquages (7111)=

70% de "199" + milieu de Fischer

10% de sérum de veau embryonnaire

10% de sérum de veau

10% d'extrait de veau embryonnaire

Le sérum embryonnaire est utilisé pour faciliter la fixation et l'étalement des cellules (Fischer, Puck et Sato, 1958).

Milieu de croissance des cultures = (7 21) on le renouvelle tous les 2 ou 3 jours.

70% de "199" + milieu de Fischer

20% de sérum de veau

10% d'extrait de veau embryonnaire

Dans tous les milieux utilisés, on ajoute 1% en volume de chacune des solutions de pénicilline et de streptomycine, ce qui revient à avoir 30 unités de pénicilline et 30 μ g de streptomycine par ml de milieu.

Le pH des milieux nutritifs est maintenu aux environs de 7,2 à 7,3 soit en faisant passer un courant d'air enrichi en CO_2 (20%) dans les flacons avant de les fermer hermétiquement, soit en maintenant les boîtes de Pétri dans une étuve à atmosphère humide où circule un courant d'air + 5% de CO_2. La température d'incubation est de 37 à 38°.

Dans nos conditions de culture, une sélection rapide des cellules de l'embryon se produit, et après 2 ou 3 jours, au moment du repiquage, les cultures ne sont plus formées que de fibroblastes.

II - Méthodes de titrages

I - Méthode d'évaluation indirecte de la concentration du virus par inoculation chez l'animal.

On a adopté la technique d'Epstein (1956), différente de celle de Bryan (1946, 1956), puisqu'au lieu d'effectuer une seule inoculation sous-cutanée par poussin, on inocule, par voie intradermique à 4 ou 5 poulets âgés de 1 à 2 mois, 3 à 5 dilutions virales allant de 10 en 10. On exprime les résultats en $\log._{10}$ de la dilution à laquelle 50% des animaux ont une tumeur; c'est la DT_{50}, définie dans l'historique du virus de Rous. Cette méthode présente de nombreux inconvénients, tels que les réactions incontrôlables de l'hôte, la lenteur de la réponse obtenue (1 mois) ; de plus, 1 DT_{50} ne correspond à 1 UP (déterminée sur 5 oeufs, voir ci-dessous) que si l'on inocule un grand nombre d'animaux (Prince 1958 a, Vigier 1959). C'est pourquoi nous ne l'avons utilisée qu'au cours de quelques expériences préliminaires de croissance du virus (chapitre II).

II - Méthodes de numération directe des particules infectieuses

a) par inoculation sur la chorio-allantoide d'oeufs de poule embryonnés âgés de 10 à 12 jours

Cette méthode, bien que connue depuis 1938 (Keogh) ne fut utilisée avec succès qu'à partir de 1955 (Rubin), grâce à l'emploi d'oeufs appartenant à des souches sensibles (Prince 1958(b)).

1) Technique

On inocule 0,05 ml ou 0,1 ml de suspensions de virus ou de cellules productrices de virus sur la chorio-allantoïde, et on compte sur cette membrane le nombre des micro-tumeurs, ou "pocks", qui s'y sont développées après une semaine d'incubation des oeufs dans une couveuse à 37°. La méthode d'inoculation est classique (Burnet 1933 - Rubin 1955); l' incubation des oeufs à été effectuée horizontalement pour tous les premiers titrages du virus ou des cellules infectées. A partir des expériences décrites dans le chapitre III, les oeufs inoculés avec le virus libre ont été incubés verticalement (Groupé, Dunkel et Manaker 1957), ce qui a permis une meilleure dispersion des pocks. La membrane, prélevée et lavée dans une solution physiologique, est étalée sur le fond d'une boîte de Pétri, posée sur un fond noir, et les pocks sont comptés à l'aide d'une loupe binoculaire au grossissement 10. Ils se présentent sous l'aspect de petites proliférations blanches arrondies ou ovales, aux contours nets, et dont les plus gros peuvent atteindre 2 mm de diamètre. Ces pocks sont des micro-tumeurs formées par la prolifération des cellules ectodermiques infectées de la chorio-allantoïde, et par l'infiltration de cellules sarcomateuses

dans le mésoderme sous-jacent. Quand on titre les cellules productrices de virus, ou centres infectieux, les pocks produits par leur inoculation semblent provenir, non pas de leur greffe sur la membrane, mais de l'infection des cellules du chorion par le virus qu'elles ont libéré (Rubin 1955).

2) Caractéristiques des résultats

Il y a une corrélation linéaire entre la concentration du virus ou de la suspension cellulaire et le nombre moyen des pocks (Keogh 1938, Rubin 1955, Prince 1958 a). Ce fait démontre qu'une particule, ou un ensemble de particules infectieuses non séparables par dilution, suffit pour produire un pock à partir d'une seule cellule infectée (Dulbecco et Vogt, 1954).

Tableau 1

Corrélation entre la concentration des suspensions cellulaires et le nombre des centres infectieux détectés sur la chorio - allantoïde

Age des cultures (jours)	Temps après repiquage (jours)	Nombre de cellules inoculées	Nombre moyen de pocks produits	Pourcentages Nombre Pocks / Nombre cell.
21	-	3.000	177	5,9
		600	47	7,8
21	-	1.500	32	2,15
		300	8,5	2,8
30	6	500	36	7,2
		100	9	8
49	25	200	114,5	57,3
		100	73	73,2
		40	48,5	120 *
60	32	100	45	45
		30	18,5	61

* Ce taux supérieur à 100 suggère que chaque cellule sarcomateuse géante peut produire plusieurs pocks sur la membrane chorio-allantoïdienne (Rubin 1957).

Le tableau I montre qu'il existe une corrélation entre la dilution et le nombre des pocks produits par l'inoculation de suspensions de cellules infectées cultivées depuis plusieurs semaines, ce qui prouve que 1 pock est produit par une cellule unique.

Variance du système

Prince (1958) et Vigier (1959) ont montré que la distribution des pocks dans une grande série d'oeufs inoculés avec une même dose de virus, n'est ni poissonienne ni normale, étant donné que la variance est très supérieure à la moyenne. Il s'agit, en réalité, d'une distribution logarithmico-normale, c'est-à-dire qu'elle est normalisée par la transformation logarithmique des nombres de pocks. En conséquence, les calculs sont effectués en considérant non pas la moyenne des nombres de pocks, mais la moyenne des log. des nombres de pocks.

D'autre part, la variance des log. des comptes individuels ne dépend pas du compte moyen des pocks, quand les résultats sont compris entre 3 et 300 pocks par membrane. C'est pourquoi il n'est pas nécessaire de titrer plusieurs dilutions; il suffit d'inoculer un certain nombre d'oeufs avec une dilution unique quand on prévoit le résultat à $\pm$ 1 log. près. En pratique, on inocule 6 à 7 oeufs embryonnés âgés de 10 à 12 jours avec 0,05 ou 0,1 ml. de suspension de virus ou d'un nombre connu de cellules.

Calcul des résultats

Par définition, chaque pock correspond à une unité pock (U.P.) ou à une particule virale libre ou libérée par une cellule; on exprime les

résultats en log. du nombre d'U.P. produites par 1 ml. d'inoculum non dilué.

$$\log. N_{UP} = \log. m + \log. v + \log. d$$

où

N_{UP} = nombre d'unités pocks produites par 1 ml d'inoculum non dilué.

m = moyenne des log. du nombre des pocks

$$v = \frac{1}{\text{volume inoculé}} \text{ ml}$$

d = dilution de l'inoculum

L'erreur standard sur la moyenne se calcule d'après la formule classique :

$$\text{variance} = \frac{\sum x^2 + \bar{x} \sum x}{n - 1}$$

$$\text{erreur moyenne} = \sqrt{\frac{\text{variance}}{n}}$$

n = nombre d'échantillons (membranes)

x = valeur de chaque échantillon (nombre de pocks sur chaque membrane)

$\bar{x}$ = valeur moyenne du nombre des pocks.

L'erreur sur une série de 5 oeufs est en général inférieure à 0,25 log. quand les oeufs sont incubés en position horizontale, et à 0,15 log quand les oeufs sont incubés en position verticale (Goldé et Vigier 1961).

Les nombres des cellules productrices de virus ou centres infectieux peuvent aussi être exprimés en pourcentage du nombre des cellules inoculées.

Remarque : certains oeufs peuvent être entièrement dépourvus de pocks même dans les séries à nombres assez élevés de pocks. Quand les conditions de titrage sont telles que les chances de rencontrer un "zéro" distributionnel sont négligeables, c'est-à-dire quand on a, en moyenne, 5 pocks par oeuf "0" non compris, les oeufs négatifs sont éliminés des calculs. La résistance de ces oeufs, dont la fréquence ne dépasse pas 5% dans nos expériences, est due à une hétérogénéité génétique (Prince 1958 b).

b) par inoculation de couches monocellulaires de fibroblastes de poulet cultivés in vitro

Cette méthode, dérivée de la méthode originale que Dulbecco (1952 - voir introduction) a mise au point pour titrer les virus cytodestructeurs, a été modifiée par Temin et Rubin (1958) en vue du titrage du virus et des cellules de Rous. Elle est basée, non pas sur la numération des zones de lyse, mais sur la numération des colonies de cellules rondes provenant de la conversion morphologique des fibroblastes sous l'action du virus (Manaker et Groupé, 1956). La présence de l'agar dans le milieu nutritif empêche à la fois la diffusion, loin du lieu d'infection primaire, de la progéniture virale, qui infecte ainsi des cellules contigües, et la migration des cellules transformées, qui restent groupées.

1) Technique

On dépose 0,2 ml de matériel à titrer (virus ou cellules infectées) sur une couche monocellulaire confluente de fibroblastes de poulet, repiqués depuis 24 h. dans des boîtes de Pétri maintenues dans les conditions standard. L'infection est effectuée après avoir éliminé

tout le milieu nutritif. S'il s'agit de titrer une suspension de virus, on laisse l'adsorption se poursuivre pendant 1 heure, puis on ajoute le milieu + agar. S'il s'agit de titrer les centres infectieux contenus dans une suspension d'un nombre connu de cellules infectées, le milieu + agar n'est ajouté qu'après avoir laissé les cellules se déposer pendant une nuit. Dans tous les cas, après 6 jours d'incubation à 37° - 38° dans les conditions habituelles, on ajoute, par dessus le milieu solide, 4 ml par boîte d'un milieu nutritif constitué par 80% de "199" et 20% de sérum de veau. On laisse en contact pendant 24 heures puis on effectue la numération des colonies cellulaires au microscope inversé, grossissement 25, après avoir posé les boîtes sur une plaque de verre quadrillée.

Milieu utilisé

C'est un milieu spécial où le sérum de veau est remplacé en majeure partie par du bacto-tryptose phosphate (Difco). En effet, Rubin (1960) a montré qu'une grande quantité de sérum, surtout de sérum embryonnaire, inhibe les modifications morphologiques qui sont à la base même de cette technique.

Le milieu nutritif est constitué par :

42,5 % de "Noble agar Difco", à 1,8% dans l'eau bi-distillée,

42,5% de "199" à double concentration,

10% de bacto-tryptose phosphate Difco,

5% de sérum de veau,

Antibiotiques, 1% pénicilline et streptomycine.

Ce milieu est maintenu à l'état liquide par immersion du récipient qui le contient dans un bain-marie à 42° ; on homogénéise avec précaution pour éviter la formation de bulles, et on répartit à raison de 7 ml par boîte.

2) Nature d'une colonie ou d'un foyer cellulaire

Chaque foyer est constitué par des cellules rondes, qui peuvent provenir théoriquement, à la fois de la conversion morphologique des fibroblastes infectés, et de la multiplication des cellules ainsi transformées. Pratiquement, étant donné que les fibroblastes sont confluents et ne se multiplient que très lentement, les foyers produits par inoculation d'une suspension virale résultent de l'infection et de la conversion cellulaires, alors que les foyers produits par inoculation d'une suspension de cellules infectées, résultent en majeure partie de la multiplication des cellules (Centres infectieux) inoculées, d'où l'aspect tridimensionel de la colonie (Temin et Rubin, 1958).

3) Caractéristiques des résultats

Comme dans la méthode de titrage sur la chorio-allantoïde, il y a une corrélation linéaire entre le nombre des foyers et la dilution de la suspension virale ou cellulaire, ce qui démontre qu'une particule infectieuse libre ou libérée par une cellule suffit pour infecter et transformer un fibroblaste en cellule ronde.

Variabilité et sensibilité de la méthode

Bien que ceci n'ait jamais été vérifié expérimentalement sur de grandes séries, on admet que la distribution des foyers est poissonnienne dans une même série de cultures, c'est-à-dire que la variance est égale à la moyenne. Cependant, quand il s'agit de séries de boîtes contenant des cellules d'embryons mises en culture à des périodes différentes, on constate qu'il peut y avoir, dans la détermination du titre d'un même virus, des différences allant d'un facteur de 1 à 10. Ceci pourrait provenir du développement "in vitro" d'un virus appelé R I F (résistance inducing factor) par Rubin (1960), apparenté ou identique au virus de la lymphomatose, et qui rend les cellules résistantes à l'infection par le virus de Rous. C'est pourquoi, excepté en ce qui concerne les centres infectieux, qui semblent être dans de meilleures conditions 'in vitro', la méthode de titrage par numération des pocks est, en général, plus sensible que la méthode de titrage par numération des foyers. Ceci est montré dans le tableau 2 où 3 suspensions de virus différentes ont été titrées parallèlement sur 2 cultures et 5 oeufs. Des résultats comparables ont été observés par Dougherty (communication personnelle).

TABLEAU 2

Titrages comparatifs du virus par numération des pocks (oeufs) et des foyers (cultures)

Virus	log. du Nombre d'unités pocks ou foyers/ml	
	sur M C A	sur fibroblastes
1	7,02	6,98
2	6,05	5,65
3	6,61	6,34

Expression des résultats

Par définition, un foyer correspond à une unité formatrice de foyer (U.F.F.), c'est-à-dire à une particule infectieuse libre, ou libérée par une cellule infectée, pouvant convertir un fibroblaste en cellule ronde.

Les résultats sont donc exprimés en log. du nombre d'unités formatrices de foyers contenues dans 1 ml de suspension non diluée et calculés d'après la même formule que celle citée précédemment à propos des titrages sur oeuf.

$$\log. N_{U.F.F.} = \log. m + \log. v + \log. d$$

Comme dans la méthode précédente, on exprime les centres infectieux en nombre moyen de foyers pour 100 cellules inoculées.

III - Préparation des suspensions virales

Il est indispensable d'utiliser une souche de virus standard homogène ayant un pouvoir infectieux élevé, si l'on veut obtenir des résultats quantitatifs reproductibles. Deux étapes sont nécessaires pour atteindre ce but : il faut d'abord disposer d'un matériel biologique à partir duquel on peut préparer des extraits bruts d'un titre déjà élevé, et ensuite utiliser une méthode de purification qui respecte le pouvoir infectieux des particules.

I - Matériel de départ

Il peut être constitué :

- par des extraits de tumeurs de poule,
- par des extraits de tumeurs de chorio-allantoïde,
- par des milieux nutritifs de cultures infectées.

On a assez rapidement abandonné les tumeurs comme matériel de départ, leurs extraits bruts contenant de très nombreux débris cellulaires qu'il est pratiquement impossible d'éliminer par purification. On a utilisé, dans la plupart de nos expériences (Chapitres III - IV - V) des milieux de cultures infectieux dont les deux avantages essentiels sont qu'ils contiennent très peu de débris cellulaires, et que l'on peut réduire la quantité de particules inactivées thermiquement par une méthode que nous décrirons plus loin.

1/ Tumeurs

a) tumeurs de poule

Elles proviennent de la souche à "haut titre" (CT 845) du Docteur Bryan, et contiennent en moyenne 10^6 à 10^7 DT_{50}/g.

b) tumeurs développées sur la chorio-allantoïde d'oeufs embryonnés (Rous et Murphy (1911))

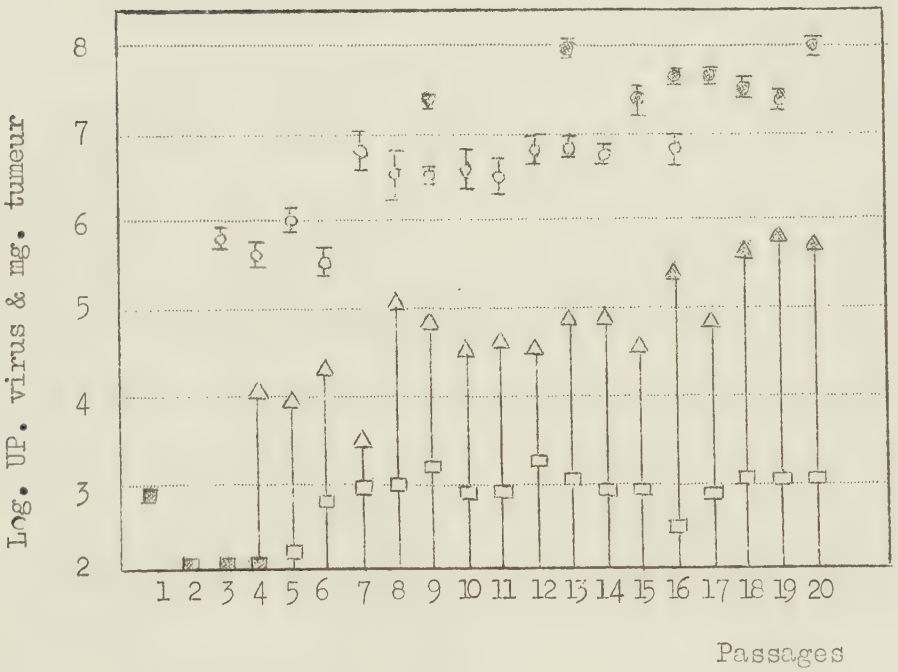
On a établi une souche de tumeurs d'oeufs à haut titre (Vigier et Goldé, 1961) en procédant de la même manière que Bryan et Moloney (1957) utilisèrent pour obtenir leur souche à haut titre chez la poule.

Méthode : après avoir obtenu la première tumeur par inoculation de 0,1 ml d'extrait brut à 10% de la tumeur de Bryan, on a inoculé en série à des oeufs embryonnés âgés de 8 jours 0,1 ml d'extraits acellulaires à 20% des tumeurs chorio-allantoïdiennes les plus grosses prélevées 8 jours après l'inoculation.

Résultats : l'examen de la figure 1, montre que le poids des tumeurs a augmenté de 10 fois entre le 5e et le 6e passage, la richesse en virus par gramme ayant augmenté dans les mêmes proportions entre le 6e et le 7e passage. Ceci peut résulter de la sélection d'un variant du virus à multiplication rapide, comme il semble que ce soit le cas pour les souches à haut titre de Bryan.

Figure 1

Titre en virus (log. UP/gr) et poids moyen (log. mg) des sarcomes chorio-allantoïdiens dans une série de passages dans l'oeuf.



○ titre des extraits bruts de sarcomes.

◉ titre des extraits trypsinés

△ dose inoculée par oeuf, extraits bruts.

▲ " " " extraits trypsinés.

▩ poids moyen des sarcomes 8 jours après l'inoculation

□ poids moyen des sarcomes 7 jours après l'inoculation

c) Préparation des extraits bruts

Après avoir pesé les sarcomes, on les broie pendant 1 minute dans du PBS⁻ contenant 0,005 % d'hyaluronidase et 1% d'antibiotiques, à l'aide d'un broyeur rotatif à couteaux de Prolabo.

Le broyat, qui est effectué à la concentration de 10 à 20% par rapport au poids primitif de tumeur, ne contient plus de cellules entières; on le centrifuge 10 minutes à 3.000 tm. pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant constitue l'extrait brut. Cependant on a constaté qu'on n'obtient pas la majorité du virus en opérant de cette façon. On peut obtenir, en effet, des suspensions brutes contenant 10 fois plus de particules si l'on fait agir de la trypsine à 0,25%, 20 min. à 37°, sur le culot de centrifugation (voir la figure 1). Il semble que ce phénomène soit dû à la désagrégation d'amas de particules virales (Carr 1944) ou à la désadsorption de ces particules de la surface des fragments de membranes cellulaires (Bernhard, Oberling, et Vigier, 1956).

Les extraits bruts obtenus par cette méthode titraient $10^{7,5}$ UP/ml (tumeurs de poule) et $10^{6,5}$ à 10^{7} UP/ml (tumeurs d'oeufs).

2 - Milieux nutritifs infectieux

On prélève les milieux nutritifs des cultures infectées à partir du moment où le palier de production virale maximum est atteint, c'est-à-dire, en moyenne, à partir du 5e jour qui suit l'infection à une multiplicité suffisante pour infecter toutes les cellules.

Au cours des premières expériences, les milieux ont été prélevés après être restés en contact avec les cellules infectées pendant

24 h. ou 48 h., ce qui entraînait la présence de nombreuses particules inactivées par la chaleur, pouvant interférer avec le virus actif, comme nous le verrons dans le chapitre II. C'est pourquoi, dans les expériences récentes, les milieux n'ont été prélevés qu'après 5 heures de contact avec les cellules infectées (Crawford 1960) ; ce temps est suffisant pour qu'un maximum de particules infectieuses soit libéré (Rubin 1955), et permet d'éviter l'accumulation des particules inactivées thermiquement.

Quand les cellules infectées se multiplient activement après l'infection, le titre atteint dès le 3e jour est de $10^{5,5}$ à 10^{6} UP par ml de milieu.

II - Méthode de purification

Les différentes méthodes de purification ont déjà été décrite dans l'historique du virus de Rous. Parmi elles, nous avons choisi la méthode de Carr et Harris (1951) pour purifier aussi bien les extraits de tumeurs que les milieux nutritifs infectieux. Dans cette méthode, qui ne permet d'obtenir qu'un virus partiellement purifié, on associe les digestions enzymatiques, trypsine (Amies et Carr 1939) et hyaluronidase (Claude 1940) à des centrifugations à grande vitesse qui sédimentent les particules virales (Claude 1937-1938).

a) Technique

On élimine d'abord les gros débris cellulaires présents dans les extraits bruts de tumeurs ou les milieux nutritifs en centrifugeant à 6.000 tm/20 min.

On diminue ensuite la viscosité des surnageants en les incubant pendant 1/2 heure à 25° en présence de 0,001% d'hyaluronidase et on les centrifuge à 30.000 g/1 h. dans un centrifugeur "Spinco" réfrigéré à 4°. Les culots contiennent toutes les particules virales et des impuretés ayant la même densité. On les remet en suspension dans un volume de trypsine à 0,05% + 0,001% d'hyaluronidase, qui représente le 1/5 ou le 1/10 du volume d'extrait brut ou de milieu initial. Après 20 minutes d'incubation à 37° en milieu agité, on neutralise la trypsine en ajoutant 10% de sérum de veau, et on centrifuge à nouveau à 30.000 g/1 h. comme précédemment. On obtient finalement de petits culots gélatineux contenant tout le virus, que l'on remet en suspension dans un volume de "199" + 20% de sérum de veau correspondant au 1/50, en moyenne, du volume de matériel brut.

Les suspensions de virus ainsi semi-purifiées ont un titre compris entre $10^{6,5}$ et $10^{7,5}$ UP/ml.

III - Conservation du virus

On a vu les principales caractéristiques du virus de Rous dans l'historique, notamment sa grande sensibilité thermique. C'est pourquoi toutes les souches standard doivent être conservées en ampoules scellées à -70°, dans des blocs de carboglace.

Les méthodes cytochimiques et les méthodes de dosages des acides nucléiques et des protéines seront décrites dans les chapitres relatifs à l'exposé des expériences au cours desquelles elles ont été employées.

CHAPITRE II

MULTIPLICATION DES CELLULES ET DU VIRUS DE ROUS DANS DES CULTURES PRIMAIRES CONFLUENTES

A - ETUDE CINETIQUE (Vigier et Goldé 1959)

I - INTRODUCTION

L'étude de la multiplication du virus de Rous "in vivo" dans différentes conditions a fait l'objet de plusieurs publications au cours des dix dernières années.

Dès 1953, Carr, étudiant la croissance du virus dans le muscle de l'aile de jeunes poulets, observait la disparition de 99% du virus injecté 16 heures après l'inoculation, suivie d'une réapparition soudaine des particules infectieuses 50 heures plus tard. En 1954, Harris rapportait des résultats comparables obtenus après l'inoculation du virus sur la chorio-allantoïde d'oeufs embryonnés. La majeure partie du virus inoculé disparaissait des cellules de la membrane et après une période de basse infectiosité, la concentration du virus augmentait brusquement entre deux et trois jours ; cette libération du virus coïncidait avec le développement

des tumeurs ectodermiques (pocks). Après deux jours,le titre du virus diminuait, tandis que les grosses tumeurs (sarcomes) se développaient. En 1957, Groupé et Rauscher obtenaient des résultats similaires en inoculant le virus dans le cerveau de poussins nouveau-nés. Ils observaient une disparition rapide du virus des cellules cérébrales, suivie d'une période stationnaire de basse infectiosité d'environ trois jours; à partir du 3e jour, le titre du virus augmentait logarithmiquement jusqu'à la mort de l'animal.

Enfin en 1958, alors que les expériences décrites dans ce chapitre étaient pratiquement terminées, Prince publiait un travail quantitatif sur la multiplication du virus dans les cellules de la chorio-allantoïde d'oeufs embryonnés. Il observait la disparition de 95 à 99% du virus inoculé pendant une période dont la durée semblait dépendre de la richesse de l'inoculum en virus. Cette période d'éclipse était suivie de deux périodes de croissance du virus, la première rapide, correspondant à l'hyperplasie ectodermique, la seconde, plus lente, correspondant à l'hyperplasie mésodermique.

Les premiers travaux quantitatifs réalisés sur des cellules cultivées in vitro selon la méthode de Dulbecco furent publiés par Rubin en 1955 et 1957. Cet auteur, étudiant la multiplication du virus dans des cellules de sarcomes prélevés chez la poule, a défini un certain nombre des caractéristiques essentielles du système cellule-virus de Rous. Il a démontré que les cellules sarcomateuses de Rous se multiplient pendant de nombreuses générations tout en continuant à libérer de petites quantités de virus. Il a établi également des formules qui permettent de calculer

la production virale par cellule, compte tenu de l'inactivation thermique du virus dans le milieu nutritif et de la vitesse de multiplication des cellules. Cependant, les conditions expérimentales utilisées par Rubin ne lui ont pas permis d'étudier les différentes périodes de la multiplication du virus à partir de l'infection initiale puisqu'il a cultivé des cellules de sarcomes déjà productrices de virus. C'est pourquoi nous avons entrepris en 1957, une série d'expériences au cours desquelles on a effectué l'étude des caractéristiques de la multiplication du virus dans des cellules d'embryon de poulet cultivées d'après la technique de Dulbecco. Les résultats de ces expériences font l'objet de la première partie de ce chapitre. Dans la seconde partie, on étudie les modifications morphologiques qui accompagnent la croissance du virus dans le système.

2 - MATERIEL et METHODES

Les suspensions cellulaires sont préparées selon la méthode standard par digestion d'un seul embryon par série expérimentale. On les ensemence selon les conditions définies plus loin, dans des flacons de Carrel contenant 1 ml de milieu nutritif.

Le milieu nutritif M 451, utilisé uniquement dans les expériences décrites dans ce chapitre comprend :

5 parties de solution d'Earle,

4 parties de sérum de cheval chauffé 1/2 h. à 56°,

1 partie d'extrait embryonnaire de veau.

Tous les titrages ont été effectués par la méthode de numération des pocks produits sur la chorio-allantoïde d'oeufs embryonnés, à l'excep-

tion de quelques expériences préliminaires au cours desquelles on a titré le virus par inoculation chez la poule.

Les suspensions de virus sont des extraits bruts acellulaires à 10%, non semi-purifiés, préparés par broyage de sarcomes développés en 2 semaines chez des poulets âgés de 2 mois et inoculés avec de hautes doses de virus standard.

3 - CONDITIONS EXPERIMENTALES

I. Modes d'infection

Le taux d'adsorption du virus sur les cellules, la multiplication du virus et des centres infectieux, ont été étudiés dans des cultures infectées de deux façons différentes.

a) Infection des cellules en suspension

Les cellules de la suspension cellulaire obtenue par trypsinisation de l'embryon sont lavées une fois dans du PBS, centrifugées et comptées après avoir été remises en suspension dans un volume déterminé de milieu 451. On ajoute à ce moment la quantité désirée de virus standard, de façon à avoir 2 à 5.10^6 cellules par ml de milieu virulent. On laisse l'infection se poursuivre pendant 45 minutes au bain-marie à 37° en milieu agité. On centrifuge ensuite les cellules, on les lave 2 fois dans 10 ml de PBS et on les remet en suspension dans le milieu 451 après les avoir comptées à nouveau. On ensemence 1.10^6 cellules infectées par ml et par flacon de Carrel.

b) Infection des cellules étalées en couche monocellulaire

On infecte les cellules 2 jours après leur mise en culture dans les conditions standard. Chaque flacon contient, à ce moment, de 3 à 5.10^5 cellules qui forment une couche monocellulaire confluente, et ne se multiplient pratiquement plus. Après avoir éliminé le milieu nutritif, on effectue l'infection en ajoutant 0,3 ml de suspension virale par flacon, qu'on laisse en contact avec les cellules pendant 45 minutes à 37-38°. On élimine ensuite la suspension virale, on rince les cultures deux fois avec 1 ml de PBS et l'on ajoute 1 ml de milieu nutritif par flacon.

II. Entretien des cultures

Dans chaque série expérimentale, des cultures témoins non infectées sont maintenues dans les mêmes conditions que les cultures infectées, ce qui permet de comparer les cellules, aussi bien au point de vue de leur multiplication que de leur aspect.

Les milieux nutritifs sont renouvelés deux fois par semaine.

Dans certaines expériences, les cultures infectées ont été repiquées après plusieurs semaines dans des bouteilles à faces planes contenant 10 ml de milieu nutritif.

III. Conduite des expériences

La quantité de virus qui s'adsorbe sur les cellules au cours de l'infection a été déterminée dans 3 séries de cultures infectées à des multiplicités différentes, en titrant le virus libre, le virus lié aux cellules et des centres infectieux (voir ci-dessous) présents au temps 0,

c'est-à-dire après 45 minutes de contact avec les cellules, et 3 heures après la fin de l'infection.

On a étudié la multiplication des cellules et du virus dans des cultures infectées à des multiplicités comprises entre 1 et 0,002 UP par cellule; certaines cultures ont été maintenues pendant 6 mois après l'infection initiale.

Les temps de prélèvements ont été choisis sur la base des résultats obtenus in vivo par Carr (1953) et Harris (1954); ils ont été effectués 3 heures après infection, puis tous les jours durant la première semaine, tous les 3 ou 4 jours durant les 2 semaines suivantes, et toutes les 2 ou 3 semaines pour les cultures conservées pendant plusieurs mois.

On arrête de 1 à 3 cultures à chaque temps de prélèvement. Après avoir prélevé tout le milieu nutritif, on détache les cellules du verre en faisant agir une solution de trypsine selon les conditions standard; on les lave deux fois de suite avec du PBS et on les compte après les avoir remises en suspension dans du M 451; on titre séparément le virus libre, le virus lié aux cellules et les centres infectieux.

Le titre du virus libre est donné par la somme du titre du virus présent dans le milieu nutritif et du titre du virus contenu dans la solution trypsique qui a servi à détacher les cellules, et dans les solutions de lavages. Ces 3 solutions contiennent les particules qui étaient adsorbées sur les cellules et qu'il est facile d'éluer par simples lavages. On les centrifuge avant de les inoculer, afin d'éliminer les débris cellulaires.

Le virus lié aux cellules est le virus libéré par destruction des cellules lavées. On le titre en inoculant une suspension d'un nombre connu

des cellules lavées et détruites par congélations et décongélations successives obtenues par immersion du tube qui les contient, 3 fois de suite, alternativement dans un mélange d'acétone + neige carbonique et dans de l'eau tiède.

Ce mode de destruction donne de meilleurs résultats que la destruction par choc osmotique ou broyage mécanique (tableau 3 a), sans doute en raison d'une inactivation moindre du virus; on voit, en effet, (tableau 3 b) que des cycles de congélations et de décongélations successives ne diminuent pratiquement pas le titre du virus en suspension dans du milieu nutritif.

TABLEAU 3

a) Influence du mode de destruction des cellules infectées lavées sur le titre du virus lié aux cellules (exprimé en moyenne des log. du nombre d'U.P. par ml de suspension).

Mode de destruction	Choc osmotique (1)	Broyage mécanique (2)	Cong. décong.
	1,73 (8)*	1,91 (11)	2,02 (10)

b) Influence de 3 congélations et décongélations successives sur le titre d'un virus en suspension dans une solution physiologique

Expérience	Virus non traité	Virus traité
n° 3	0,61 (7)	0,55 (5)
n° 4	0,57 (6)	0,61 (7)

(1) Le choc osmotique est produit en ajoutant à la suspension cellulaire un égal volume d'eau distillée. Cette technique provoque une agrégation de particules ce qui abaisse par conséquent le titre.

(2) Le broyage est effectué pendant 5 minutes dans un broyeur en verre de Potter.

* Les chiffres mis entre parenthèses représentent le nombre d'oeufs inoculés.

Les centres infectieux sont les cellules lavées qui produisent du virus après leur inoculation sur la chorio-allantoïde d'oeufs embryonnés.

4 - RESULTATS

I - Adsorption du virus (tableau 4)

La quantité de virus adsorbée sur les cellules ne représente qu'une très faible partie de l'inoculum. En fait, on ne trouve aucune différence significative entre le titre du virus infectant avant et après 45 minutes de contact avec les cellules ; les résultats sont identiques, que les cellules soient en suspension ou étalées en couche monocellulaire.

Les titrages effectués immédiatement après l'infection, au temps 0, montrent qu'il existe une correspondance entre le nombre des cellules porteuses de virus, inoculées entières sur la chorio-allantoïde, et le titre du virus lié aux cellules libéré par destruction de ces cellules. Ceci démontre que les pocks produits à ce moment par les cellules entières proviennent de l'élution des particules adsorbées qui n'ont pu être éliminées par lavages, et non de la libération de nouvelles particules. Les quantités de particules virales adsorbées sur les cellules sont 30 à 600 fois plus faibles que celles présentes dans l'inoculum. De plus, la majorité de ce virus adsorbé lié aux cellules, présent au temps 0, s'élue spontanément dans le milieu de culture, comme le montrent les résultats des titrages effectués 3 heures après infection.

TABLEAU 4

EXPERIENCES D'ADSORPTION DU VIRUS sur des cellules de cultures primaires infectées en couche monocellulaire.

Exp.	Moment du prélèvement (heures)	log du nbre total de cellules	log. de la dose initiale de virus	log. du nbre des cellules porteuses de virus	log. du Titre en U.P.		
					Cellules (VLC)	Milieu (VL)	Total VT
1	0	5,3	5,0	2,8	3,4	-	3,4
	3	5,3			2,8	3,5	3,6
2	0	5,6	4,0	1,6	1,8	-	1,8
	3	5,5			1,6	1,9	2,1
3	0	5,6	3,0	0,8	0,8	-	0,8
	3	5,4			-	1,2	1,2

Chaque culture est effectuée dans un flacon de Carrel contenant 1 ml de milieu. Les cellules étalées sont infectées avec 0,3 ml de suspension virale pendant 45 minutes. On détermine le nombre des cellules porteuses de virus en les inoculant intacte sur la chorio-allantoïde de l'oeuf embryonné tout de suite après l'infection, au temps0. Le virus lié aux cellules (VLC) est titré en faisant éclater les cellules par 3 congélations et décongélations successives. Le virus libre (VL) est titré en inoculant le milieu nutritif des cultures infectées.

Le virus total (VT) est la somme de VLC et VT.

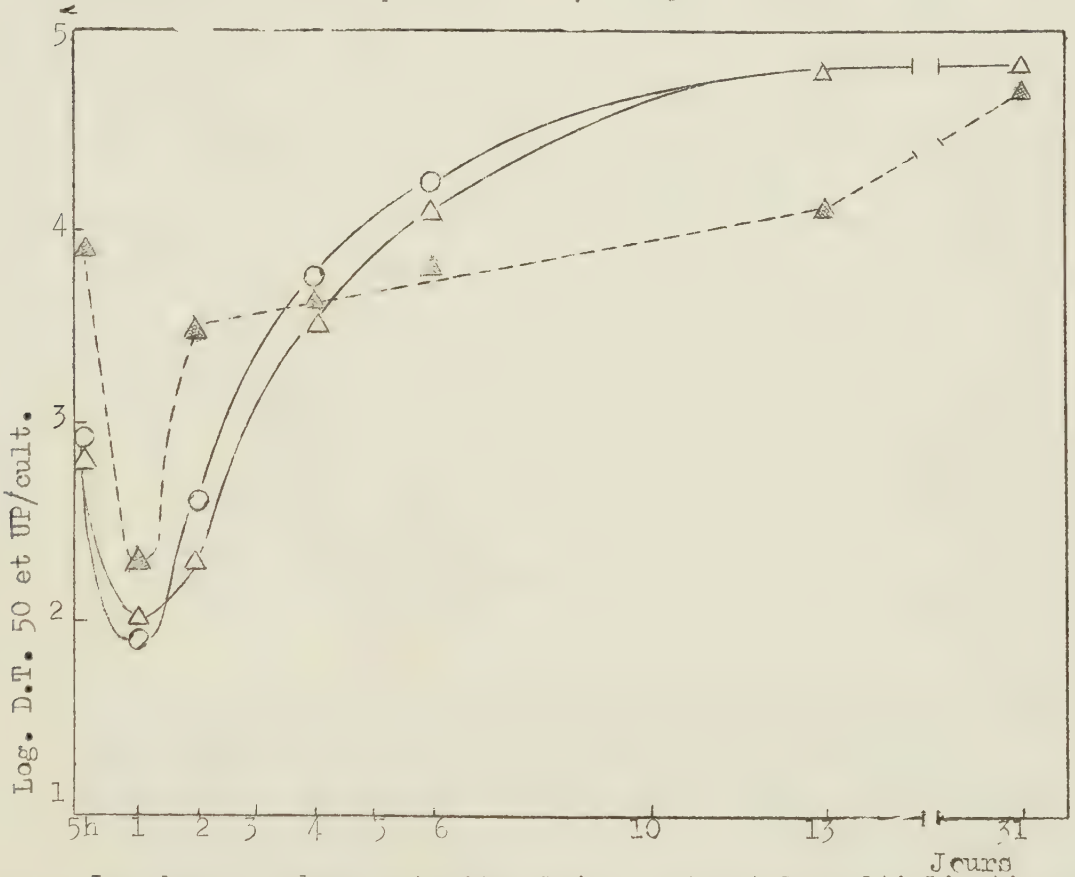
Les titrages ont été effectués 0 et 3 heures après la fin de la période d'adsorption et les titres sont exprimés en $\log._{10}$ du nombre d'unités pocks (U.P.)

II - Courbes de multiplication du virus et des cellules

La figure 2 montre l'allure générale de 2 courbes de multiplication du virus dans des cellules infectées à une multiplicité de 1 UP/10 cellules soit en suspension, soit en couche monocellulaire. Elle permet de montrer l'équivalence des résultats obtenus par les deux modes d'infection, ainsi que l'équivalence des titres trouvés par inoculation chez l'animal et dans l'oeuf.

Figure 2

Courbes comparatives de la multiplication du virus dans des cultures confluentes formées de cellules infectées en suspension ou en couche monocellulaire à une multiplicité de 0,1 UP par cellule.



Les deux courbes en traits pleins montrent la multiplication du virus dans des cultures formées de cellules infectées en suspension (conditions standard). Chaque titrage a été fait parallèlement par inoculation de dilutions appropriées du milieu nutritif chez le poulet (△—△ DT_{50}) et sur la chorio-allantoïde d'oeufs embryonnés (○—○ UP). La courbe en pointillés (▲.....▲) représente la multiplication du virus dans des cellules infectées en couche monocellulaire après 2 jours de culture, et titré par inoculation du milieu chez le poulet (DT_{50}).

Chaque point des courbes correspond au titre moyen du virus par culture, calculé d'après les titres de 2 à 3 cultures différentes. Les titres sont exprimés en log. du nombre d'unités pocks (UP) ou de doses tumorigènes (DT_{50}).

1/ Période de latence ou d'éclipse

On voit dans le tableau 5, que le titre du virus total décroît d'une façon importante pendant les 24 heures qui suivent l'infection, quelle que soit la multiplicité initiale d'infection.

Tableau 5

DETERMINATION DE LA DUREE DE LA PERIODE D'ECLIPSE après infection des cellules étalées en couche monocellulaire à différentes multiplicités - Titrages 0-3 h., 24 h. et 48 h. après infection.

Exp.	log. de la dose initiale de virus (UP)	Multiplicité d'infection UP/cell.	log. du titre du virus en U.P.					log. du nombre des centres infectieux à 24h.
			0-3 h.	24 h.			48 h.	
			VT	VT	VL	VLC	VT	
N 8	5,5	1/1		1,7	1,5	1,3	3,0	2,9
N 3	5,3	1/2	3,6	2,0			3,0	
N 1	5,0	1/5	3,6	1,8	1,8	-		
N 9	4,7	1/10		2,2	2,2	-	3,4	2,8
N 2	4,0	1/50	2,1	-	-	-		
N 6	3,7	1/100		0,8	0,8	-	1,6	
N 4	3,5	1/100	1,2	-	-	-	1,8	
N 5	2,9	1/400		-	-	-	1,4	1,4
N 3	3,0	1/500	1,2	-	-	-		

Chaque culture effectuée en flacon de Carrel a été infectée avec 0,3 ml de suspension virale pendant 45 minutes. Après l'infection, les cellules ont été lavées 3 fois de suite et remises en présence de 1 ml de milieu nutritif. On a titré le virus total (VT) 3 h. après infection, le virus lié aux cellules (VLC) et le virus libre (VL) 24 h. et 48 h. plus tard. Les centres infectieux, c'est-à-dire le nombre des cellules productrices de virus, ont été déterminés 24 h. après infection en inoculant un nombre connu de cellules infectées, lavées, sur la chorio-allantoïde. Les titres sont exprimés en log. du nombre d'unités pocks (U.P.). Le signe - indique qu'aucun pock n'a été trouvé sur la chorio-allantoïde, et par conséquent qu'aucune particule infectieuse n'était présente dans l'inoculum.

Avec une seule exception, aucune particule infectieuse n'est trouvée dans les cultures infectées aux doses inférieures à 1 UP/10 cell. Aux doses supérieures à 1 UP/10 cell., le virus titré à 24 h. ne représente plus que 1 à 5% du virus présent à 0 h. Il est, dans la majorité des expériences, à l'état libre dans le milieu, les cellules détruites ne contenant aucune particule infectieuse.

Le titrage des centres infectieux, effectué 24 heures après infection, montre qu'il y a 100 fois moins de cellules productrices de virus que d'unités infectieuses mises au contact des cellules durant l'infection. Le fait qu'à ce moment, l'inoculation des cellules éclatées ne donne aucun pock sur la chorio-allantoïde, prouve qu'aucune particule infectieuse n'est plus adsorbée sur les membranes ou n'est présente dans les cellules, et démontre bien que les pocks produits par inoculation des cellules entières proviennent des particules nouvelles synthétisées et libérées au contact de la membrane de l'oeuf par chaque cellule infectée.

2/ Période de croissance

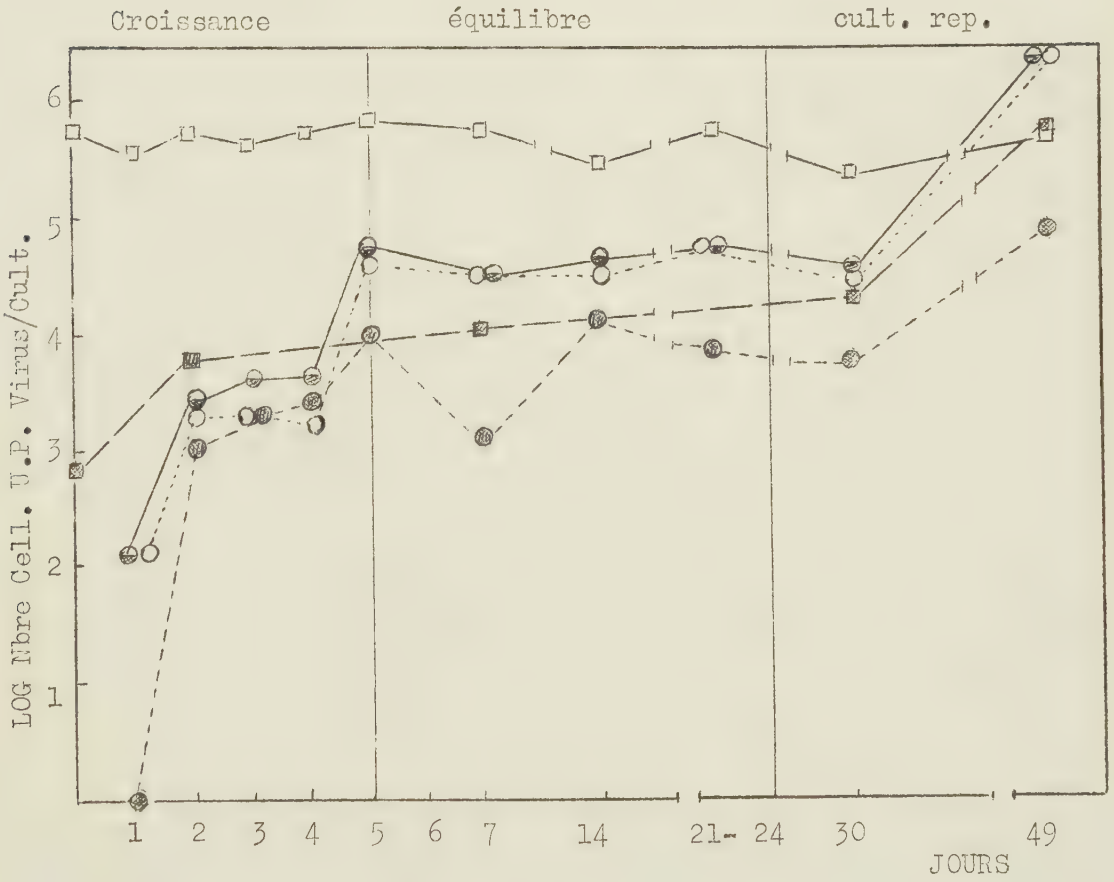
Après la période d'éclipse, le titre du virus augmente brusquement, comme on peut le voir dans les figures 3 et 4.

L'augmentation la plus précoce s'est produite entre 32 et 40 heures après infection. Elle s'est produite 48 heures après infection dans 7 expériences et 72 heures après infection dans 2 autres expériences.

L'augmentation du virus lié aux cellules ne précède jamais celle du virus libre; c'est même le phénomène inverse qui se produit dans les expériences à multiplicité initiale d'infection faible (figure 4).

Figure 3

Courbe de croissance des cellules infectées et du virus en fonction du temps après l'infection de cultures primaires confluentes à la multiplicité de 0,1 UP par cellule.

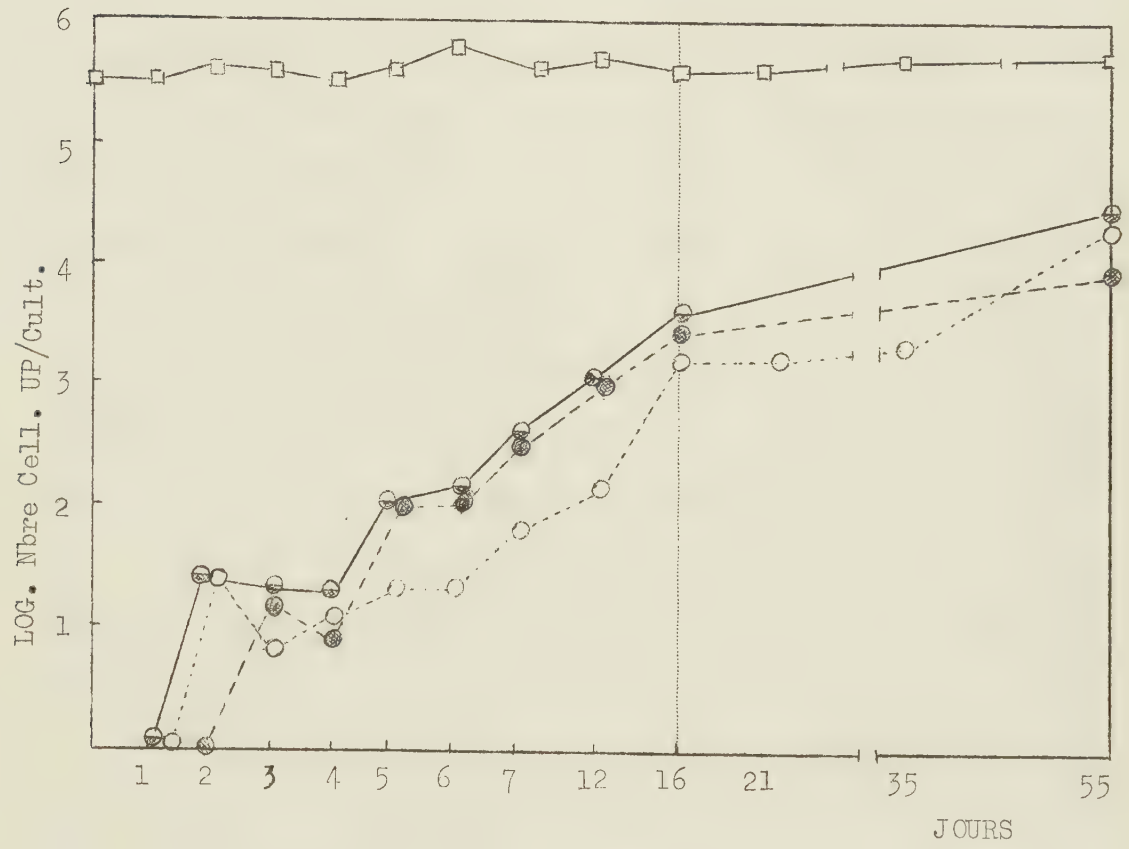


On a compté le nombre total de cellules (□——□) et on a titré le virus libre (○-----○), le virus lié aux cellules (●- - -●), le virus total, qui est la somme du virus libre et du virus lié aux cellules (○——●) et les centres infectieux (▨- - -▨).

Les résultats sont exprimés en log. du nombre des cellules ou des unités pocks de virus par culturefaite en flacon de Carrel.

Figure 4

Courbes de croissance des cellules et du virus en fonction du temps après l'infection de cultures primaires confluentes à la multiplicité de 0,0025 UP par cellule.



Dans cette expérience, aucun repiquage n'a été effectué. On a compté, comme dans la figure 3, le nombre total de cellules (□——□) et on a titré le virus libre (○- - - - -○), le virus lié aux cellules (●- - - -●) et le virus total (◍——◍).

Les résultats sont exprimés en log. du nombre des cellules ou d'unités pocks de virus par culture.

L'examen des figures 3 et 4 montre que la première augmentation du titre du virus est suivie d'un plateau, d'une durée comparable à celle de l'éclipse, et durant lequel le virus lié aux cellules et le virus libre ont un titre pratiquement stationnaire.

Après ce plateau, une seconde augmentation du titre du virus s'est produite dans 5 expériences ; elle a été suivie d'un second plateau et d'une 3e augmentation du titre du virus total dans 2 expériences. A chaque étape cependant, les augmentations du virus total sont plus faibles, la première augmentation représentant 10 à 100 fois la quantité du virus présente à la fin de l'éclipse, les 2 suivantes ne représentant que 3 à 10 fois la quantité de virus présente au moment du plateau précédent.

Le titre du virus produit au cours de la première augmentation 48 h. après l'infection semble bien être en corrélation avec le nombre des centres infectieux titrés durant la période d'éclipse, 24 h. après infection (tableau 5).

D'après la figure 3, il semble que l'augmentation du nombre des centres infectieux observée 2 jours après l'infection est en corrélation avec la seconde montée du titre du virus entre 4 et 5 jours.

Au cours des expériences de multiplication, notre attention s'est portée sur le problème de la richesse des solutions de lavage des cellules infectées, en particules infectieuses. On a constaté qu'à partir d'une semaine après l'infection, la quantité de particules infectieuses éluées par lavage des cellules est supérieure à la quantité de particules présentes à l'état libre dans le milieu nutritif. C'est pourquoi le titrage du virus libre contenu dans le milieu de culture seul n'est valable qu'au

cours de la première semaine qui suit l'infection. Au delà de ce temps, il est indispensable de lui ajouter le titre de virus contenu surtout dans les solutions utilisées pour effectuer les deux premiers lavages, où se trouvent 99% des particules virales adsorbées sur les membranes.

3/ Période d'équilibre

Après une période dont la durée est, en moyenne, inversement proportionnelle à la multiplicité initiale d'infection, le titre du virus cesse d'augmenter et se stabilise à un certain niveau, ainsi que le nombre des centres infectieux qui représentent alors 1/10 à 1/100 du nombre total des cellules d'une culture. C'est la période d'équilibre, pendant laquelle le virus total est surtout formé par le virus libre et pour une faible part seulement par le virus lié aux cellules.

Cette période dure aussi longtemps qu'on ne repique pas les cellules. Elle a duré 3 semaines dans l'expérience de la figure 3. Cependant, dans l'expérience de la figure 4, où aucun repiquage n'a été effectué, le titre du virus libre augmenté de 10 fois entre le 35e et le 55e jour. Etant donné que dans cette expérience, le virus libre contenu dans les liquides de lavage n'a pas été titré, l'augmentation du titre du virus présent dans le milieu nutritif ne signifie pas forcément que le titre du virus total libre, compte tenu des liquides de lavages, aurait augmenté dans les mêmes proportions. De même, le fait que le titre du virus libre est inférieur au titre du virus lié aux cellules est dû à cette omission du titrage des liquides de lavages, puisqu'on a vu précédemment qu'ils contiennent de grandes quantités de virus à partir du 8e jour après l'infection.

III - Calcul du taux de libération du virus par les cellules infectées

On calcule la production virale par centre infectieux d'après les formules établies par Rubin en 1955, dans lesquelles on tient compte de l' inactivation thermique du virus et de la vitesse de multiplication des cellules.

Inactivation thermique (figure 5)

Rubin a démontré que l'inactivation thermique du virus de Rous en suspension dans une solution physiologique + 10% de sérum, est exponentielle ; nous ne l'avons pas vérifié à nouveau. Nous l'avons déterminée expérimentalement en titrant les suspensions de virus standard dilué dans du milieu 451 et le virus libéré dans les milieux de cultures infectées depuis plusieurs jours ou plusieurs semaines, avant et après 24 heures d'incubation à 37 - 38° .

La période d'inactivation thermique T, correspond à la période de temps, en minutes, durant laquelle la moitié du virus présent au temps 0 est inactivée à la température d'incubation. On la calcule par la formule :

$$\frac{Vt}{Vo} = e^{-k_2 t} \qquad \text{(Rubin 1955)}$$

dans laquelle Vt = titre du virus au temps t,

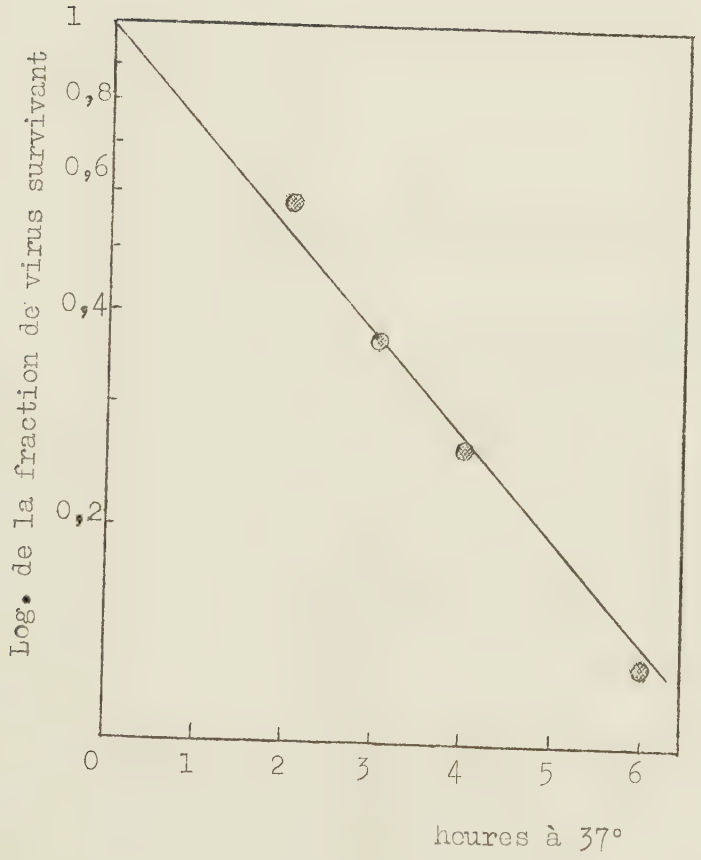
Vo = titre du virus au temps 0,

k_2 = constante calculée d'après les résultats expérimentaux.

Figure 5

Cinétique de l'inactivation thermique du virus du sarcome de Rous dans le milieu de culture à 37° C.

(d'après Rubin, 1957)



On a, en général, déterminé T graphiquement puisque l'inactivation est exponentielle.

Les différents lots de virus standard avaient des périodes d'inactivation de 130, 140 et 168 minutes.

Le temps moyen d'inactivation du virus libéré dans le milieu de cultures infectées depuis quelques semaines était de 155 minutes, ce qui est comparable aux résultats obtenus par Rubin. Dans une de nos expériences, ce temps était de 250 minutes, ce qui est très supérieur à la moyenne. Ceci peut être dû à une action protectrice des substances mucoïdes qui étaient présentes en grandes quantités dans les milieux des cultures infectées depuis plusieurs semaines ou plusieurs mois.

Production par centre infectieux

Connaissant le nombre total des centres infectieux par culture, le titre du virus total au moment où le palier d'équilibre de la production est atteint, et la période d'inactivation thermique, on peut calculer la production par centre infectieux en appliquant la formule établie par Rubin pour les systèmes formés de cellules ne se multipliant pas :

$$k1 = \frac{V_a k_2}{N}$$

ou k_1 = production par cellule et par jour.

V_a = titre du virus présent dans le milieu au moment où le palier de production est atteint.

N = le nombre des centres infectieux.

k_2 = constante (voir formule précédente)

Dans une telle population où les cellules ne se multiplient plus, le virus inactivé thermiquement continue à s'accumuler bien que le titre

du virus actif soit constant. La fraction du virus total qui reste active à un moment donné t, varie en raison inverse du temps et de la période d'inactivation thermique.

$$\frac{V_a}{V} = \frac{I}{k_2 t}$$

V = virus actif + virus inactivé.

Dans les cultures en période d'équilibre (T = 150 minutes) et après repiquage (T = 150 minutes et 300 minutes), la production par cellule et par jour était comprise entre 10 et 30 U.P., quelle que soit la multiplicité initiale d'infection.

5 - INTERPRETATION DES RESULTATS

Le fait que la quantité de virus lié aux cellules à la fin de la période d'adsorption est proportionnelle à la multiplicité d'infection ne signifie pas que ces particules jouent un rôle dans l'infection. Au contraire, leur élution dans le milieu, durant les 3 heures suivantes, prouve qu'il s'agit de virus résiduel adsorbé sur les cellules (tableau 4).

Les résultats obtenus pendant le premier jour qui suit l'infection démontrent que les particules qui pénètrent dans les cellules passent rapidement sous une forme non infectieuse. On a en effet, constaté que le virus disparaît totalement des cultures infectées aux multiplicités les plus faibles. Quant aux particules infectieuses titrées 24 heures après l'infection dans le milieu des cultures infectées aux plus hautes doses, elles correspondent au virus résiduel adsorbé sur les cellules, comme l'indiquent les titrages effectués à 3 h., et qui s'est en partie inactivé thermiquement après s'être

élué spontanément dans le milieu. Il y a donc également dans ces cultures, une disparition totale du virus infectieux, confirmée par l'absence de tout virus lié aux cellules. On en déduit que les particules infectieuses qui pénètrent dans les cellules passent rapidement sous une forme non infectieuse, ce qui est en accord avec les observations faites in vivo par Carr (1953), Harris (1954), Groupé et Rauscher (1957) et Prince (1958 b). Cependant, nos résultats se rapprochent plus particulièrement de ceux que Prince a obtenus en infectant la chorio-allantoïde, où il a observé la disparition totale du virus après l'infection. Nous pouvons donc conclure que le virus de Rous entre dans une période d'éclipse complète après sa pénétration dans les cellules cultivées en couche monocellulaire.

La longue durée de la période d'éclipse observée dans notre système est comparable à celle rapportée in vivo par Carr, Harris, Groupé et Rauscher. Prince a observé une période d'éclipse plus courte (15 h.) et les résultats qu'il a obtenus suggèrent que cette durée peut être diminuée en modifiant les conditions expérimentales, notamment en augmentant la concentration du virus dans l'inoculum. Ce point sera plus particulièrement étudié dans le chapitre suivant. Néanmoins, on peut dire dès maintenant que la période d'éclipse du virus de Rous est beaucoup plus longue que celle de la plupart des autres virus ; par exemple, la première augmentation du titre du virus du fibrome de Shope après l'infection de cellules de lapin cultivées in vitro (Harel 1956, Constantin, Febvre et Harel 1956) se produit dès la 6e heure.

Le fait de trouver les particules infectieuses d'abord à l'état libre dans le milieu, au début de la période de multiplication, et ensuite

(un jour plus tard) sous forme de virus lié aux cellules, suggère que les particules ne deviennent infectieuses qu'après avoir été libérées par la cellule dans le milieu extérieur. Ces résultats sont en accord avec les observations morphologiques effectuées au microscope électronique sur des coupes de tumeurs (Gaylord 1955, Bernhard, Oberling, et Vigier, 1956 - Haguenau, Dalton et Moloney 1958) ou sur des cellules d'ascite de Rous (Epstein 1957). Ces auteurs ont en effet constaté que toutes les particules ayant les caractéristiques morphologiques du virus mûr (75 mμ de diamètre ; double membrane), sont réparties dans les espaces inter-cellulaires, sur les membranes externes des cellules et dans des vacuoles intracytoplasmique. Ces vacuoles résulteraient de la pynocytose des particules libres présentes dans le milieu extérieur (Benedetti et Bernhard, 1958). Il est vraisemblable que ce que nous appelons virus lié aux cellules est formé par ces particules intra-vacuolaires qui ne peuvent être libérées qu'après destruction de la cellule. Par conséquent, les particules virales mures ne sont identifiables qu'à l'extérieur de la cellule, ce qui suggère, comme nous l'avons dit précédemment, que le virus n'acquiert le pouvoir infectieux qu'après avoir traversé la membrane cellulaire. Ce phénomène n'est pas particulier au virus de Rous, puisqu'il a été décrit dans le cas du virus de la maladie de Newcastle, par Rubin, Franklin et Baluda (1957). Le fait que le virus libéré est en grande partie adsorbé sur les membranes cellulaires, d'où il s'élue spontanément ou après lavage, a été confirmé récemment par Vogt et Rubin (1961) et Bergs et Groupé (1961).

La multiplication du virus en plusieurs étapes, dont chacune est caractérisée par l'augmentation du titre du virus total survenant après l'augmentation du nombre des centres infectieux (figure 3), suggère que les

différents paliers de la courbe correspondent à des infections secondaires, successives, des cellules qui n'ont pas été infectées initialement. L'arrêt des augmentations qui détermine la fin de la période de multiplication et le début de la période d'équilibre survient alors que 2 à 10% seulement des cellules sont productrices de virus. Ce faible nombre des centres infectieux peut s'expliquer soit par la résistance à l'infection de la majorité des cellules, soit par l'existence d'un grand nombre de cellules infectées à l'état latent, ne libérant pas de virus infectieux. La seconde hypothèse semble la plus correcte, compte tenu des résultats obtenus au cours d'expériences ultérieures (chapitre III et V) d'après lesquels la vitesse de synthèse du matériel viral et de libération des particules infectieuses est d'autant plus rapide que l'activité métabolique de la cellule est plus intense. Or, pour qu'une cellule soit détectée comme centre infectieux, il faut qu'elle ait eu le temps de libérer du virus durant les 30 premières heures qui suivent son inoculation sur la chorio-allantoïde (Rubin 1955). Etant donné que dans les expériences dont il est question dans ce chapitre, l'infection a été effectuée sur des cellules qui ne se multiplient plus, qui sont âgées de quelques jours et qui ont, par conséquent un métabolisme très faible, il est vraisemblable que bien qu'infectées, elles ne synthétisent pas les précurseurs viraux assez rapidement pour libérer des particules infectieuses dans les limites de la méthode de titrage. Le fait que le repiquage, qui fait se multiplier activement toutes les cellules, est suivi d'une augmentation très importante du nombre des centres infectieux (figure 3) vient à l'appui de cette hypothèse. De plus, l'aspect d'une fraction importante de la population cellulaire dans les cul-

tures non repiquées infectées aux multiplicités les plus élevées, tend à confirmer que les cellules non productrices de virus sont infectées à l'état latent.

Le taux de production du virus, durant la période d'équilibre et dans les cultures repiquées, est plus élevé que celui de 1 à 5 U.P./ cell./jour rapporté par Rubin (1955) dans les cultures récentes de cellules de sarcome de Rous. Cependant, dans des cultures plus âgées (deux semaines) Rubin, en 1957, observait une augmentation importante de la production en corrélation avec la taille des cellules, laquelle augmentait avec le temps. On a également observé, après repiquage des cultures infectées aux plus hautes doses, une augmentation importante de la taille d'environ 25% des cellules, dont l'aspect, comme nous le verrons plus loin, rappelle celui des cellules sarcomateuses cultivées in vitro . Il est possible que l'augmentation de la production totale du virus provienne en partie d'une augmentation de la production par centre infectieux plutôt que d'une augmentation du nombre des cellules productrices de virus. En effet, on a considéré que une cellule produit un seul pock sur la membrane de l'oeuf, mais étant donné que de grosses cellules peuvent, en fait, donner plusieurs pocks (Chapitre I, tableau 1), on a pu surestimer le nombre des centres infectieux et par conséquent, sous-estimer le taux de production par cellule et par jour dans les plus vieilles cultures.

Il ressort de ces premières expériences, pour lesquelles la plupart des méthodes expérimentales ont dû être mises au point, que les fibroblastes d'embryons de poule cultivés selon la méthode de Dulbecco constituent un matériel très favorable à l'étude de la multiplication du virus de Rous.

On a démontré l'existence de trois périodes distinctes (éclipse, croissance, équilibre) de multiplication du virus et des cellules infectées, et l'étude de la répartition du virus dans les cultures au cours de ces différentes périodes, nous a permis de voir qu'il ne semble acquérir le pouvoir infectieux qu'après avoir été libéré par la cellule dans le milieu extérieur. On a constaté également qu'une partie de la population de fibroblastes infectés est convertie en cellules arrondies. Afin de vérifier que ces cellules arrondies sont productrices de virus et proviennent bien de l'infection et de la conversion morphologique des fibroblastes, on a entrepris dans la seconde partie de ce chapitre l'étude quantitative des modifications morphologiques qui se produisent dans les cultures au cours du cycle de croissance du virus.

B - ETUDE QUANTITATIVE DES ALTERATIONS MORPHOLOGIQUES CELLULAIRES PROVOQUEES PAR LE VIRUS DE ROUS. (Goldé 1959)

Dès les premières années qui suivirent la découverte du virus de Rous, différents expérimentateurs étudièrent les caractéristiques morpholigiques des cellules de Rous en examinant les cellules sarcomateuses de fragments de tumeurs en culture, et tentèrent de définir la nature des cellules infectables en soumettant différentes espèces cellulaires à l'action du virus.

Comme l'ont montré Carrel (1924 a-b) et Fischer (1924), les cellules issues de fragments de sarcomes de Rous cultivés in vitro appartiennent à deux types morphologiques différents, l'un fibroblastique, et l'autre monocytaire (cellules amoeboïdes). Ces deux auteurs notèrent la grande hétérogénéité de taille de ces cellules, qui fut confirmée ultérieurement par Zweibaum (1933), Doljanski et Tonebaum (1942), et constatèrent que seuls les monocytes pouvaient reproduire une tumeur par greffe chez l'animal après plusieurs mois de culture in vitro. En particulier, Carrel obtint une culture pure de fibroblastes devenus non greffables après 8 jours de culture du fragment de tumeur d'où ils étaient issus. Ces auteurs conclurent que seules les cellules amoeboïdes sont les cellules néoplasiques. En 1925, Carrel réussit à cultiver le virus de Rous après avoir infecté, in vitro, les macrophages du sang de poulet qui étaient encore greffables 20 jours après l'infection. En 1926, ce même auteur, après avoir

cultivé le virus pendant plusieurs mois dans des fibroblastes sans noter aucun changement morphologique, conclut que le virus de Rous peut infecter des cellules sans en modifier l'aspect. Des observations semblables furent faites par Ludford en 1937. Ce n'est qu'en 1941 que Halberstaedter, Doljanski et Tenenbaumapportèrent la preuve que les cellules amoeboïdes typiques descellules de sarcome cultivées in vitro, peuvent avoir pour origine des cellules fibroblastiques infectées par le virus. Les cellules qu'ils obtinrent après l'infection desfibroblastes in vitro avaient, en effet, toutes les caractéristiques des cellules tumorales et étaient encore greffables 60 jours après l'infection. En 1942, Doljanski et Tenenbaum, et en 1943 Tenenbaum, étudiant en détails la morphologie des cellules de Rous en culture, soulignèrent que la distinction entre cellules fusiformes et amoeboïdes est assez artificielle, étant donné que l'on peut passer de l'une à l'autre forme par une simple modification de la richesse du milieu en extrait embryonnaire. En 1952, Sanford, Likely, Bryan et Earle confirmèrent que les fibroblastes sont les cellules les plus sensibles au virus de Rous, sans toutefois noter aucune modification morphologique. En 1955, Lo, Gey et Schapras obtinrent in vitro, comme Halberstaedter et coll., la conversion des fibroblastes de muscle de poule en cellules de Rous, mentionnant l'apparition des premières altérations environ 8 jours après l'infection des cellules. Enfin, en 1956, au cours d'expériences réalisées chez l'animal, Loomis et Pratt établirent une certaine corrélation entre les modifications morphologiques observées après l'inoculation du virus dans les fibroblastes du muscle de l'aile, et l'apparition des cellules tumorales typiques du sarcome de Rous.

Cependant, l'étude des rapports qui peuvent exister entre certaines altérations cellulaires survenant après infection, et la multiplication du virus n'est possible que dans un système tel que celui dont nous disposons, où l'on peut connaître les caractéristiques de la multiplication du virus et le nombre des cellules productrices dans des cultures maintenues durant plusieurs semaines ou plusieurs mois.

I - METHODES EXPERIMENTALES

Les cellules destinées à être examinées au microscope après fixation et coloration sont ensemencées dans des tubes de 1 cm. de diamètre sur 20 cm. de long, dont le fond comporte une paroi latérale plate qui sert de support à une lamelle fine de 1,8mm/6 mm. Les tubes, bouchés avec un bouchon de caoutchouc, sont maintenus immobiles dans une position suffisamment inclinée pour que les cellules étalées sur la lamelle soient recouvertes par 1 ml de milieu nutritif. Les conditions de culture: sont les mêmes que celles décrites dans la première partie de ce chapitre, ainsi que les conditions d'infection des cellules étalées. Les multiplicités initiales d'infection sont, comme précédemment, comprises entre 0,002 et 1 UP/cellule. A chaque série de cultures infectées faites en flacons de Carrel et utilisées pour étudier la croissance du virus et des cellules, correspondent deux séries parallèles de cultures sur lamelles infectées et non infectées, toutes issues du même embryon.

Les cultures sur lamelles infectées et non infectées sont arrêtées, fixées et colorées tous les jours jusqu'au 5e jour après l'infection, puis le

10e, 20e et 30e jours, ensuite tous les mois. A chaque arrêt, 1 à 3 flacons de Carrel sont utilisés pour déterminer le titre du virus total et le nombre des centres infectieux.

On utilise la méthode de titrage sur oeuf comme précédemment.

Fixation et coloration des cellules

Après les avoir lavées pendant 5 minutes à 37° dans une solution physiologique, on fixe les cellules étalées sur la lamelle en les soumettant pendant 30 secondes à l'action de vapeurs d'acide osmique à 2%. On immerge ensuite les lamelles dans de l'alcool à 70°. Les colorations que nous avons utilisées sont classiques.

La coloration de Giemsa, effectuée dans de l'eau bidistillée tamponnée au pH 6,7, permet de colorer les structures générales de la cellule. Les acides nucléiques sont colorés à l'aide d'une solution de vert de méthyle-pyronine ou du réactif de Schiff (méthode de Feulgen, spécifique de l'ADN). Les mucopolysacharides sont colorés par le réactif de Schiff après oxydation par l'acide périodique (réaction de PAS) avec ou sans digestion préalable par l'hyaluronidase (1 h. - 37° ; 150 TRU/ml) ; les lipides sont colorés par le noir soudan, la coloration de fond étant obtenue après action d'une solution d'hématoxyline.

Les différentes espèces cellulaires sont déterminées à chaque prélèvement en comptant 200 à 400 cellules par culture colorée au Giemsa.

2 - RESULTATS

I - Cultures non infectées

Elles ont été gardées et observées pendant 2 mois.

Elles sont formées en majeure partie de cellules fusiformes ou fibroblastes dont la taille augmente légèrement au cours de l'expérience (6 µ x 80 µ à 5 jours et 10 µ x 100 µ à 50 jours). Elles ont un grand noyau ovale, à chromatine finement granulaire renfermant 1 ou 2 nucléoles, et un cytoplasme clair, peu basophile, contenant des granules fins PAS^+, formés par une substance du type acide hyaluronique digestible par l'hyaluronidase (Goldé 1956).

On y observe également la présence de 5 à 20% de monocytes ou macrophages d'un diamètre de 40 à 50 µ , avec 1 ou 2 noyaux ronds renfermant chacun 1 ou 2 nucléoles, et un cytoplasme basophile bien étalé. On constate la présence de 1 à 2 % de petites cellules basophiles d'un diamètre de 10 à 20 µ avec un noyau petit très foncé, ovale, excentrique, et un cytoplasme peu étalé limité souvent par des pseudopodes. Ces petites cellules se trouvent sur un plan supérieur à l'ensemble des autres cellules et la présence des pseudopodes suggère qu'elles doivent être très mobiles.

Le tableau 6 montre que les proportions relatives des fibroblastes et des monocytes n'ont pratiquement pas varié pendant toute la durée de l'expérience (Photo n° 7 fin du chapitre).

TABLEAU 6

POURCENTAGES DES DIFFERENTES ESPECES CELLULAIRES durant les périodes de croissance du virus dans l'expérience n° 9

	Moment du prélèvement (jours)	Fibroblastes		Monocytes		Monocytes renfermant la zone paranucléaire		Petites cell. basophiles		Cellules géantes	
		Témoin	Cultures infectées	Témoin	Cultures infectées	Témoin	Cultures infectées	Témoin	Cultures infectées		Cultures infectées
Période de	1	93	78	5	12	0	0,5	2	10	0	
croissance	3	89	76	9	17	0	1,5	2	7	0	
	5	92	59	7	36	0	5,5	1	5	0	
Période	10	70	54	29	4I	0	6	1,5	5	0	
d'équilibre	2I	80	57	20	30	0	6	0	2	11	
Cultures	50	86	39	14	49	0	2	0	2,5	9,5	
repiquées	65		38		35	0	3,5		2,5	25	

Dans cette expérience, la multiplicité initiale d'infection a été de 1 UP/10 cellules.

A chaque prélèvement on a examiné par lamelle 300 à 400 cellules fixées à l'aide de vapeurs d'acide osmique et colorées au giemsa.

II - Cultures infectées

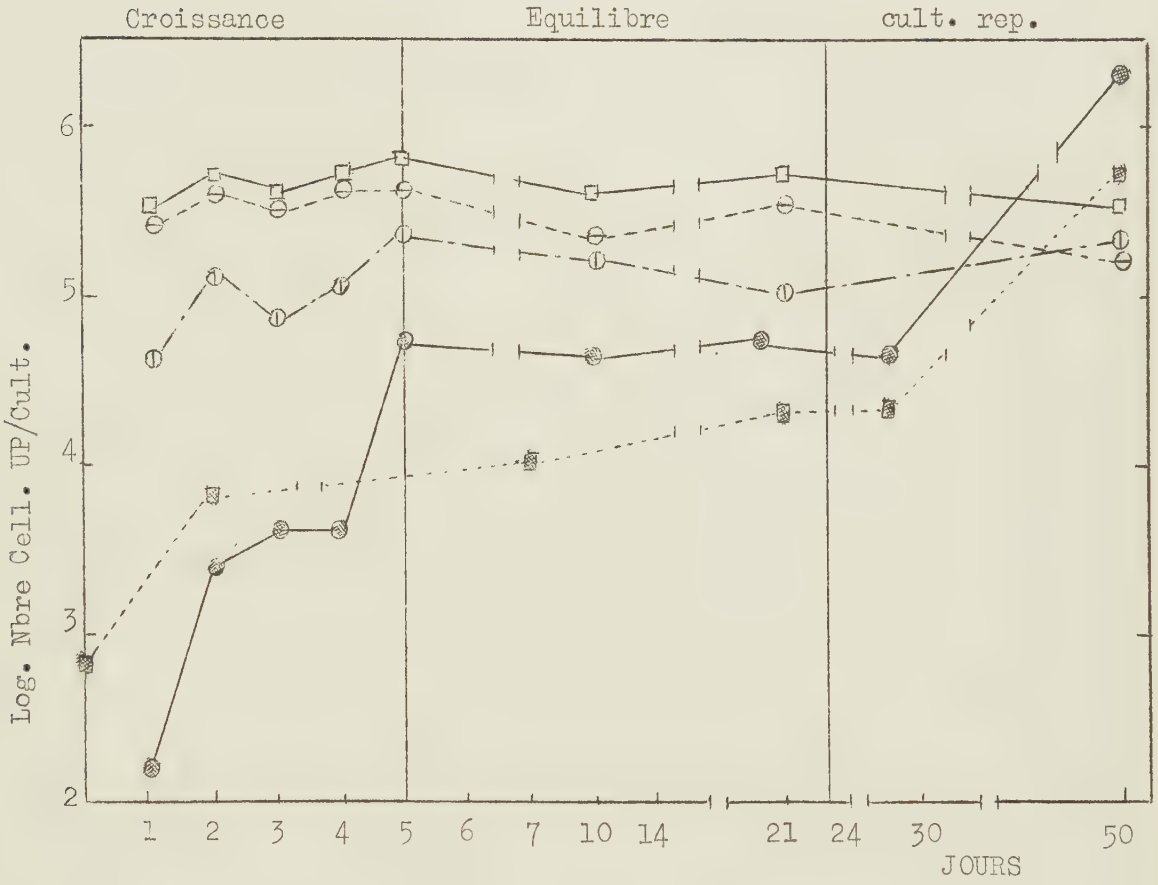
Alors que les cultures non infectées sont surtout formées de fibroblastes disposés régulièrement, on est frappé de voir dans les cultures infectées aux plus hautes multiplicités, dès les premiers jours qui suivent l'infection, un changement dans les proportions des différentes espèces cellulaires, qui s'accompagne d'un désordre croissant des cellules. (Photos 1, 2, 3, 4).

On voit dans le tableau 6 et la figure 6, que la transformation des fibroblastes en cellules rondes se produit immédiatement après l'infection des cellules. Après un palier d'équilibre de 3 jours, la proportion des deux types cellulaires varie à nouveau et la diminution du nombre des fibroblastes qui survient entre 3 et 5 jours, à la fin de la période de multiplication, est compensée par l'augmentation du nombre des monocytes.

Le fait le plus remarquable est la présence d'une masse cytoplasmique d'aspect globuleux, très basophile, accolée au noyau, dans un certain nombre des monocytes et des petites cellules basophiles ; nous l'appelons " zone para-nucléaire ". On peut voir, dans la figure 7, que le nombre des cellules qui la renferment augmente du 1er au 2e jour après l'infection, puis se stabilise du 2e au 3e jour avant d'augmenter à nouveau de façon très importante jusqu'à la fin de la période de multiplication du virus. L'allure de la courbe d'accroissement du nombre des cellules renfermant cette masse basophile est la même que celle du titre du virus total, et cet accroissement coïncide avec l'accroissement du nombre des centres infectieux.

- Figure 6 -

Différentes espèces cellulaires au cours des périodes de la croissance du virus et des cellules infectées, dans des cultures primaires confluentes infectées à la multiplicité de 0,1 UP par cellule.



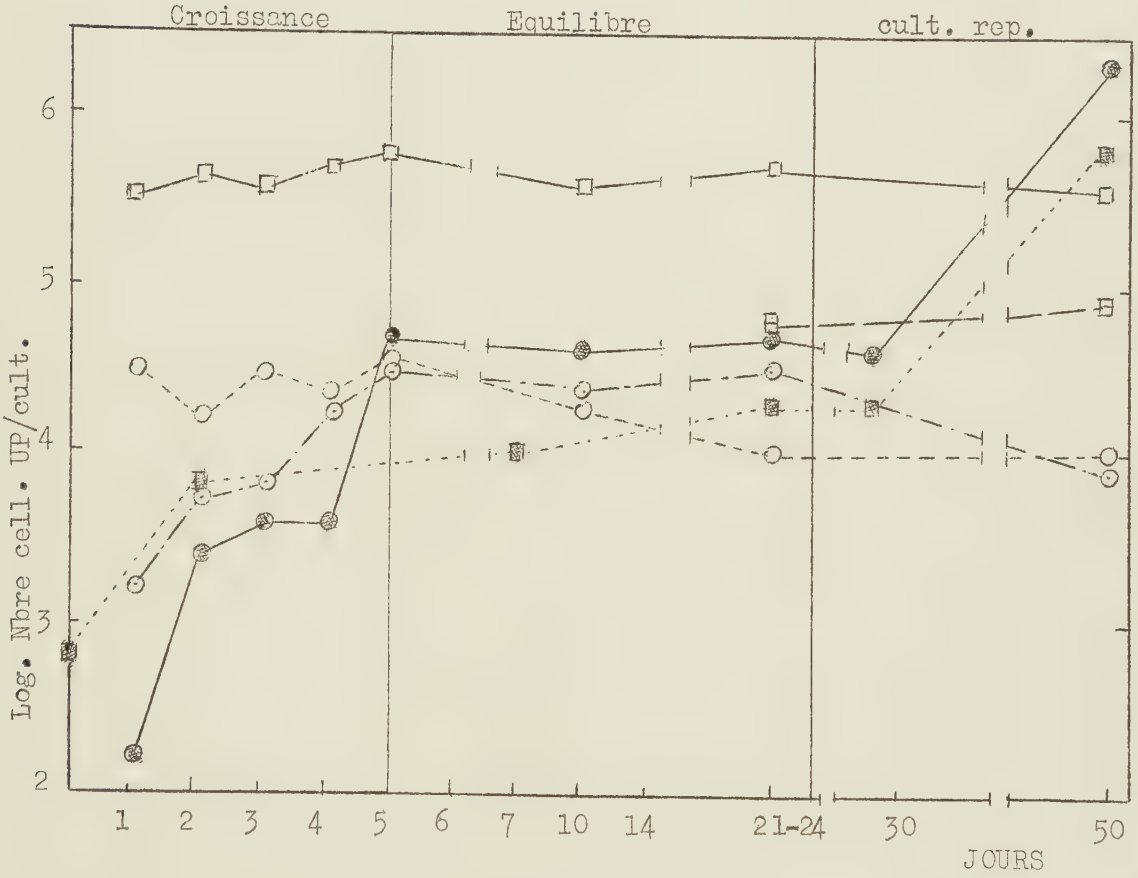
A chaque temps de prélèvement, on examine, par lamelle, 300 à 400 cellules fixées par des vapeurs d'acide osmique et colorées au giemsa, et on titre le virus et les centres infectieux de 2 à 3 cultures faites parallèlement en flacons de Carrel.

Nombre total de cellules ——
Fibroblastes – – – – –
Centres infectieux .....
Monocytes – · – · –
Virus total ——

Les résultats sont exprimés en log. du nombre des cellules ou des unités pocks de virus par culture.

- Figure 7 -

Différentes espèces cellulaires au cours des périodes de la croissance du virus et des cellules infectées, dans des cultures primaires confluentes infectées à la multiplicité de 0,1 UP par cellule.



Il s'agit de la même expérience que celle représentée dans la figure 6.

- Nombre total de cellules
- Petites cellules basophiles
- Monocytes renfermant la zone para-nucléaire.
- Cellules géantes, d'un diamètre supérieur à 50 µ
- Centres infectieux.
- Virus total.

Pendant la période de multiplication, les petites cellules basophiles sont en nombre plus élevé que dans les cultures témoins et sont fréquemment rassemblées par groupes de 8 ou 10 cellules. Il est possible qu'elles représentent des cellules en voie de division, car un grand nombre d'entre elles sont reliées 2 par 2 par un long filament.

Durant la période d'équilibre, la stabilité des différents types cellulaires, y compris les cellules renfermant la zone para-nucléaire, correspond à la stabilité du titre du virus et du nombre des centres infectieux. Cependant, bien que les cellules conservent le même type, elles sont le siège de nombreuses altérations qui les différencient nettement des cellules non infectées. Une partie des fibroblastes, bien que de taille normale, a un cytoplasme très basophile, parfois même éosinophile, avec des vacuoles incolores ou basophiles, et un noyau à membrane épaisse et à chromatine répartie en mottes. On n'observe jamais ces altérations dans les fibroblastes des cultures non infectées. Quelques fibroblastes infectés deviennent très grands et renferment la zone para-nucléaire basophile. Les monocytes ont un aspect de plus en plus hétérogène. Certains ont une taille et un aspect identiques aux monocytes des cultures non infectées, tandis que d'autres qui constituent la majorité des cellules dans les cultures infectées aux plus hautes multiplicités, deviennent très grands, plus de 50 μ de diamètre, et même géants, plus de 100 μ de diamètre. Ces deux dernières catégories représentent 10 % de la population cellulaire totale pendant la période d'équilibre des cultures infectées avec 1 UP/10 cell. et s'observent à partir de la 2e ou 3e semaine qui suit l'infection (Photo n° 4).

Les noyaux de ces cellules ont une taille supérieure à la moyenne, leur chromatine est irrégulièrement répartie en mottes et l'on y observe la présence de vacuoles non colorables par aucune des méthodes que nous avons employées. Chaque cellule contient un ou deux noyaux, rarement 3 ou 4. Le cytoplasme est dans l'ensemble formé de deux parties : la partie centrale dense, près du noyau qu'elle repousse à la périphérie de la cellule correspond apparemment à un stade plus avancé de l'évolution de la zone para-nucléaire, et a une taille double ou triple de celle du noyau. Elle est très basophile, ou à la fois basophile et éosinophile, (Photo n° 5), et peut être limitée par une couronne de vacuoles très basophiles, colorables par le noir soudan ce qui prouve la présense de lipides à leur niveau. La partie périphérique très étalée, peu basophile, renferme un système mitochondrial très développé, on y observe quelquefois des granules denses très éosinophiles répartis au hasard ou groupés dans des vacuoles. La zone para-nucléaire forme la partie centrale du cytoplasme de 5 % des monocytes et de quelques fibroblastes géants.

Après le premier repiquage, les altérations du noyau et du cytoplasme observées dans les grandes cellules monocytaires durant la période précédente s'accentuent. En particulier, la taille des cellules augmente (noyau et cytoplasme), tandis que leur capacité à se multiplier diminue ; en effet, à partir du 3e mois de culture, on les maintient seulement en survie en changeant régulièrement des milieux nutritifs, ce qui leur permet de produire du virus pendant encore 3 mois. La zone para-nucléaire n'est plus identifiable dans la plupart des cellules qui la renfermaient, ce qui explique la diminution de leur pourcentage, à partir du 50e jour de culture. On observe la présence de cellules géantes qui forment 25 % de la population cellulaire totale

après 2 mois de culture, et qui ont des diamètres supérieurs à 100μ, atteignant parfois 400μ.

En dehors des grandes cellules et des cellules géantes qui ne constituent que le quart de la population, la culture est formée (bien que l'on ait 100 % de centres infectieux) en majeure partie de fibroblastes et de monocytes de taille peu supérieure à la normale. Cependant, l'aspect de ces cellules est tel que la confusion avec des cellules du même type dans les cultures non infectées est impossible. Leurs noyaux sont vacuolaires, avec des nucléoles arborescents, et leur cytoplasme contient de nombreuses vacuoles incolores, basophiles ou éosinophiles. La substance éosinophile forme parfois un réseau extra-cellulaire entre les cellules. (Photo n° 6).

La majorité des cellules, et surtout les grandes cellules, contiennent des masses cytoplasmiques irrégulières, PAS^+, de nature différente de celle des granules décrits précédemment dans les fibroblastes normaux, car ils ne sont pas digestibles par l'hyaluronidase.

III - INTERPRETATION DES RESULTATS.

Nous avons obtenu, comme Halberstaedter, Doljanski et Tenenbaum (1941) et Lo, Gey et Schapras (1955) la conversion des fibroblastes de poulet en cellules identiques aux cellules de sarcome de Rous. Le fait que Carrel (1926) Sanford, Likely, Bryan et Earle (1952) n'aient pas observé de modifications morphologiques après l'infection des fibroblastes suggère que leur inoculum viral était trop peu concentré pour infecter, et en conséquence, altérer la morphologie d'un nombre appréciable de cellules. On a constaté que la diminution du nombre des fibroblastes

correspond à une augmentation du nombre des monocytes, ce qui démontre que dès le début de l'infection, le virus provoque la conversion des fibroblastes en cellules arrondies; ceci est confirmé par le fait que le phénomène s'accentue jusqu'à la fin de la période de croissance du virus. Loomis et Pratt (1956), après avoir inoculé le virus dans le tissu ventral de l'aile de poulet, ont également observé au sein de ce tissu une diminution du nombre des cellules fusiformes correspondant apparemment à l'augmentation du nombre des petites cellules rondes basophiles, sans pouvoir toutefois donner de résultats quantitatifs. Dans notre système, l'action du virus sur la morphologie des fibroblastes est immédiate, mais la conversion semble indépendante de la production des particules infectieuses étant donné que le pourcentage des monocytes est très supérieur à celui des centres infectieux durant les périodes de multiplication et d'équilibre. Cependant, l'aspect anormal de la majorité des cellules pendant ces deux périodes suggère qu'elles peuvent être infectées à l'état latent ; elles ne deviendraient capables de synthétiser et de libérer le virus qu'après le premier repiquage, hypothèse que nous avons déjà envisagée dans la discussion des résultats de la première partie du chapitre.

D'autre part, le parallélisme entre le nombre des cellules monocytaires renfermant la zone-para-nucléaire basophile, le nombre des centres infectieux et le titre du virus total démontre que c'est bien la synthèse du matériel viral et la production des particules infectieuses qui sont responsables de la formation de cette zone durant les périodes de multiplication et d'équilibre. La présence de l'antigène viral au niveau de la masse basophile vient d'ailleurs d'être confirmée par Vogt et Rubin (1961) grâce à la technique de coloration par les anticorps fluorescents. Une masse cytoplasmique d'aspect comparable, mais éosinophile, a été décrite par Barski, Endo et Monaci (1953) dans les cellules humaines et de singe

infectées in vitro par le virus de la poliomyélite. Harding et Mc Limans (1956) et Shaver, Barron et Karzon (1958) ont montré qu'il existe une corrélation entre le nombre des cellules contenant la masse éosinophile et le titre du virus produit. Dans notre système, comme dans le leur, la localisation cytoplasmique de cette inclusion, qu'on n'observe jamais dans les cellules des cultures non infectées, tend à démontrer que les métabolismes de l'acide ribonucléique et des protéines sont impliqués dans la synthèse du matériel viral. En particulier, la basophilie intense de la zone para-nucléaire dans les cellules infectées par le virus de Rous est un argument en faveur de l'augmentation du taux de synthèse de l'ARN, fait qui sera confirmé par les dosages chimiques (chapitre V), et est, par conséquent, en accord avec les observations d'après lesquelles le matériel génétique du virus de Rous serait un acide ribonucléique (Epstein 1958, Crawford 1960-1961). Les caractéristiques de l'accroissement du nombre des monocytes, en particulier de ceux renfermant la zone basophile durant la période de multiplication sont en faveur de l'hypothèse d'après laquelle le titre du virus augmenterait à la suite d'infections secondaires. En effet, la transformation de 10 à 15 % des fibroblastes en cellules rondes tout de suite après l'infection, puis la stabilisation des deux types cellulaires durant 3 jours, suivie d'une part d'une nouvelle transformation de 15 % des fibroblastes en monocytes, d'autre part de l'augmentation parallèle des cellules renfermant la zone para-nucléaire et du titre du virus total, suggère qu'une partie des fibroblastes non infectés initialement ont été infectés secondairement le 3e jour.

L'augmentation de la surface des cellules infectées étalées sur le verre correspond à une augmentation réelle de leur volume (voir chapitre V) et se produit dès l'infection. Par analogie avec les observations faites par Temin et Rubin (1958) sur des cellules sarcomateuses cultivées in vitro, on peut penser que durant environ un mois, les cellules infectées in vitro ont le même nombre de chromosomes que les fibroblastes non infectés, alors qu'au delà de ce temps, elles deviennent polyploïdes.

Les fibroblastes et les monocytes infectés à l'état latent et devenus producteurs de virus au cours des repiquages successifs, subissent des altérations de plus en plus prononcées qui les font évoluer vers les formes géantes, dont le pourcentage augmente progressivement. Après un certain temps de culture (environ 3 mois) les altérations du métabolisme doivent être telles qu'elles sont incompatibles avec la multiplication des cellules, d'où l'impossibilité de les repiquer. Il semble donc que les cellules géantes, qu'elles soient issues de fibroblastes infectés in vitro ou in vivo (Rubin 1957), sont des cellules en voie de dégénérescence, bien que capables de produire du virus pendant quelques semaines encore. La présence d'une faible proportion de fibroblastes géants est en accord avec l'existence d'un variant du virus de Rous qui ne provoque pas la conversion morphologique des fibroblastes qu'il infecte (Temin 1960) (voir plus loin). Toutes les altérations morphologiques que nous avons observées dans les cellules géantes monocytaires sont identiques à celles que Zweibaum (1933) Tenenbaum (1943) Tenenbaum ét Doljanski (1943) ont décrites dans les cellules de sarcomes cultivées in vitro.

La substance éosinophile que Borrel (1936) considérait comme spécifique des cellules de Rous, est présente dans nos cultures aussi bien dans les cytoplasmes cellulaires qu'à l'extérieur des cellules. D'autre part, les mucoprotéines présentes en grande quantité dans le milieu ou sous forme d'inclusions cytoplasmiques PAS+ correspondent vraisemblablement aux mucopolysaccharides du type acide hyaluronique ou chondroïtine sulfurique identifiés cytochimiquement dans des cellules de sarcomes in vitro (Goldé 1956) ou in vivo (Loomis et Pratt 1956), ou chimiquement dans les tumeurs animales (Kabat 1939, Harris, Malmgren et Sylven 1954, Goldé et Vigier 1959). Leur production par des cellules infectées in vitro vient d'être confirmée par Erichsen, Eng et Morgan (1961).

L'ensemble de ces observations démontre que les cellules du type monocyte obtenues in vitro par la conversion des fibroblastes sous l'action du virus sont morphologiquement et métaboliquement identiques aux cellules de sarcome. La démonstration que ces cellules sont effectivement néoplasiques vient d'être faite par Dougherty et Morgan (1962). Ces deux auteurs, utilisant le fait, signalé dès 1913 par Rous, que la résistance de la poule à l'infection par le virus est distincte de la résistance à la greffe des cellules tumorales, ont obtenu des tumeurs en inoculant les cellules infectées et converties in vitro à des animaux immunisés contre le virus. Dans ces conditions, le développement de la tumeur n'a pu provenir que de la multiplication des cellules greffées.

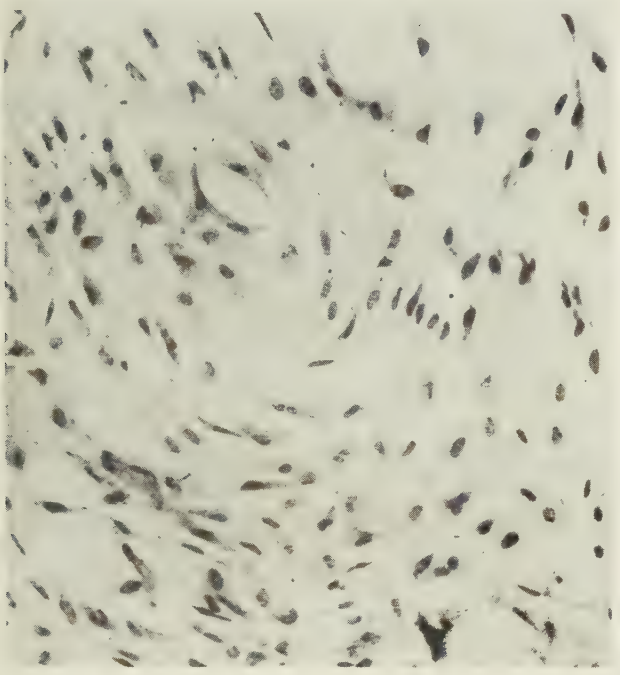
D'autre part, des travaux de Temin (1960-1961) montrent que la conversion morphologique des cellules infectées est sous la dépendance du génome viral. Cet auteur à en effet isolé deux variants du virus de Rous correspondant à deux types morphologiques distincts des cellules

dans lesquelles ils se multiplient ; l'un est du type fibroblastique, ce qui peut expliquer la présence, dans nos cultures, d'un petit nombre de fibroblastes géants apparemment infectés, l'autre est du type monocytaire, et est à l'origine des cellules évoluant en cellules d'aspect sarcomateux qui constituent la majorité de nos cultures. Temin a démontré que chaque cellule peut être infectée par les deux variants du virus et peut les produire simultanément, son aspect n'étant gouverné que par l'un deux. Ce fait n'est pas particulièr au virus de Rous. En effet, le virus de la myéloblastose aviaire transforme in vitro les cellules de poulet en cellules d'aspect néoplasique (myéloblastes, ostéoblastes, Beaudreau et coll. 1960 - Baluda et Goetz 1961), et le virus du polyome de la souris modifie l'aspect des cellules de la souris et du hamsteraprès leur infection en culture (Vogt et Dulbecco 1960). En ce qui concerne le virus de Rous et le virus du polyome, on verra à la fin du chapitre suivant que différentes expériences suggèrent que la conversion morphologique de la cellule infectée est indépendante de la production des particules infectieuses.

ASPECT DES CULTURES INFECTEES (0,1 UP/cellule)

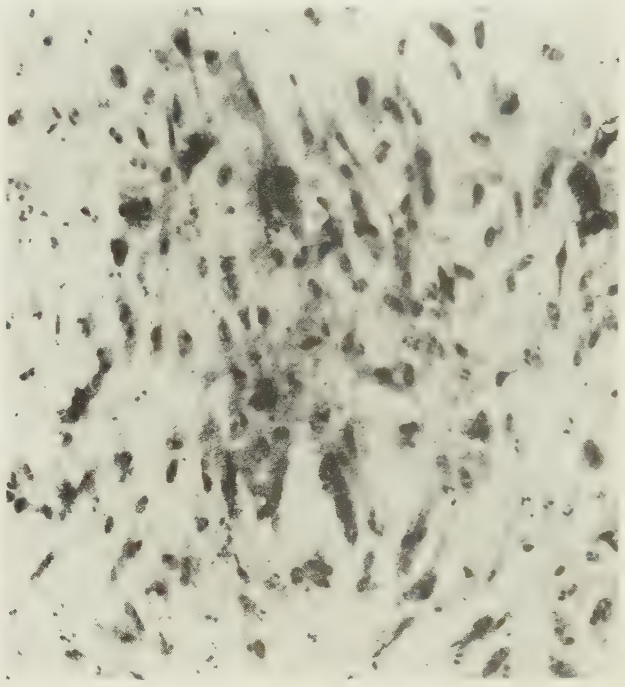
au cours des périodes de multiplication du virus

Ces cultures sont rincées, fixées dans des vapeurs d'acide osmique à 2 %, et colorées au giemsa.



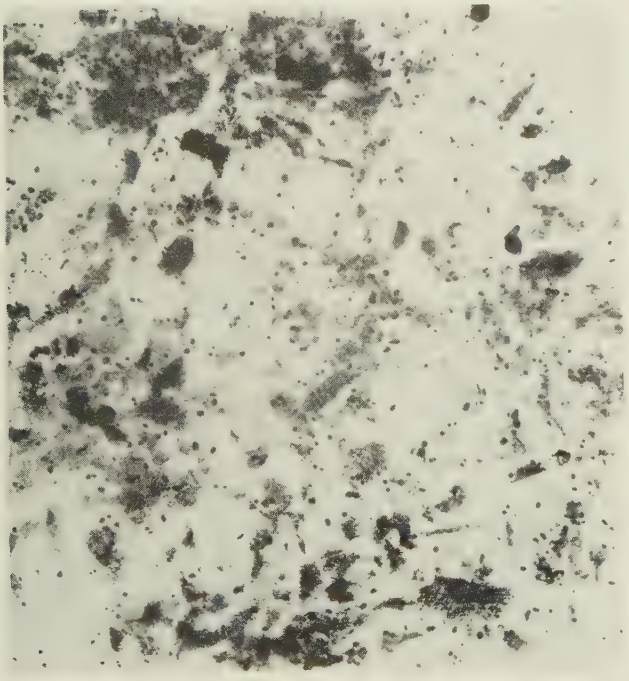
1 - CULTURE INFECTEE 1 JOUR APRES INFECTION
(Gross^{t} = 180)

On remarque une majorité de fibroblastes.



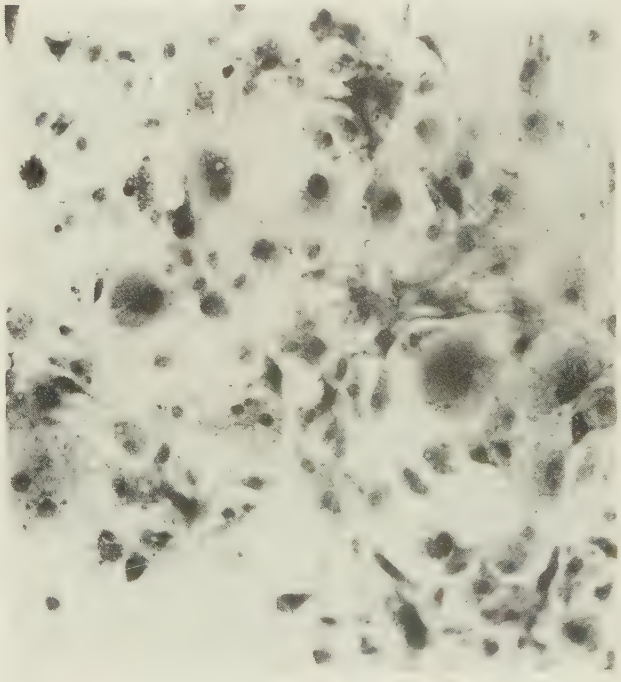
2 - CULTURE INFECTEE 5 JOURS APRES INFECTION
(Gross^{5} = 180)

Une partie des fibroblastes est convertie en monocytes. On peut observer une augmentation de la basophilie d'une partie des cellules. Quelques cellules renferment la zone para-nucléaire basophile.



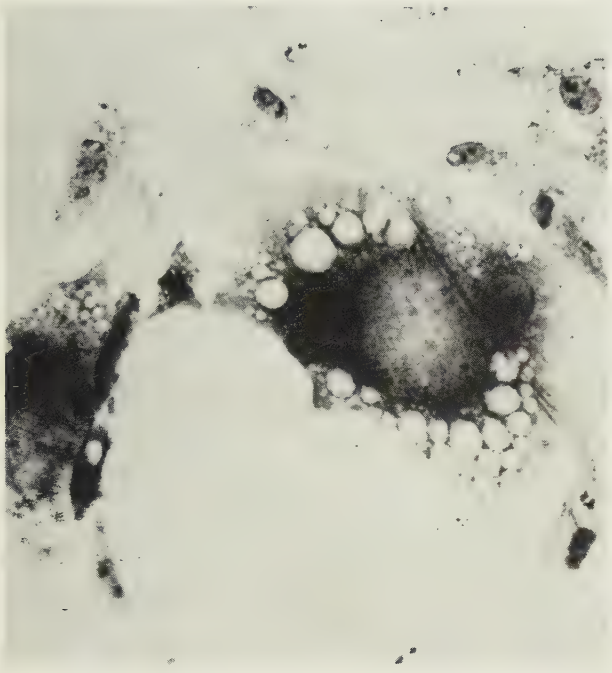
3 - CULTURE INFECTEE 10 JOURS APRES INFECTION, c'est-à-dire durant la période d'équilibre (Gross^{t} = 180)

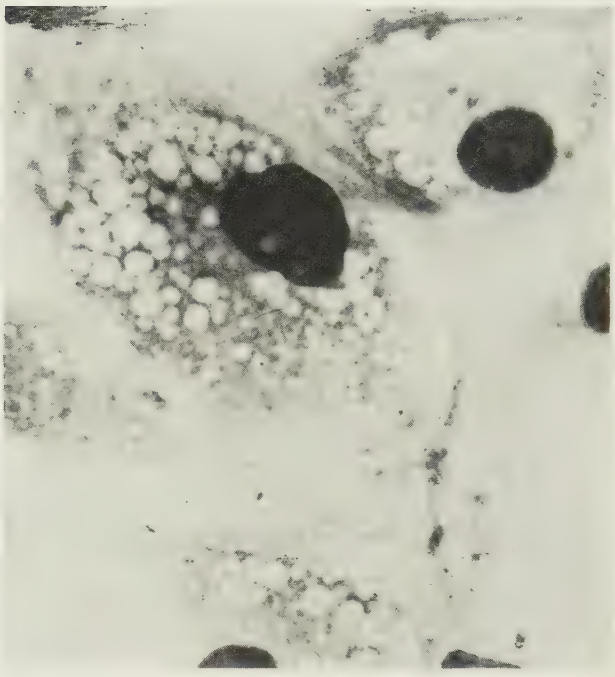
L'anarchie cellulaire augmente, ainsi que la basophilie et la taille des cellules.



4 - CULTURE INFECTEE 49 JOURS APRES INFECTION, c'est-à-dire après repiquage (Gross^{t} = 180)

On constate la présence d'un grand nombre de cellules géantes, ayant 100 µ de diamètre au minimum. On distingue bien, dans certaines d'entre elles, les 2 parties caractéristiques des cellules d'aspect sarcomateux, (voir texte).





5 – CELLULES D'UNE CULTURE INFECTEE DEPUIS 21 JOURS (Gross^{t} = 880)

Il s'agit d'une cellule convertie, d'aspect identique aux cellules de sarcome cultivées in vitro.
Elle comporte deux noyaux, dont l'un très foncé est peu apparent. Entre ces deux noyaux, se trouve la zone para-nucléaire très différente de son aspect primitif, puisqu'elle est éosinophile avec une bordure basophile. On peut comparer la taille de cette cellule à celle des petites cellules monocytaires et fibroblastiques qui l'entourent.

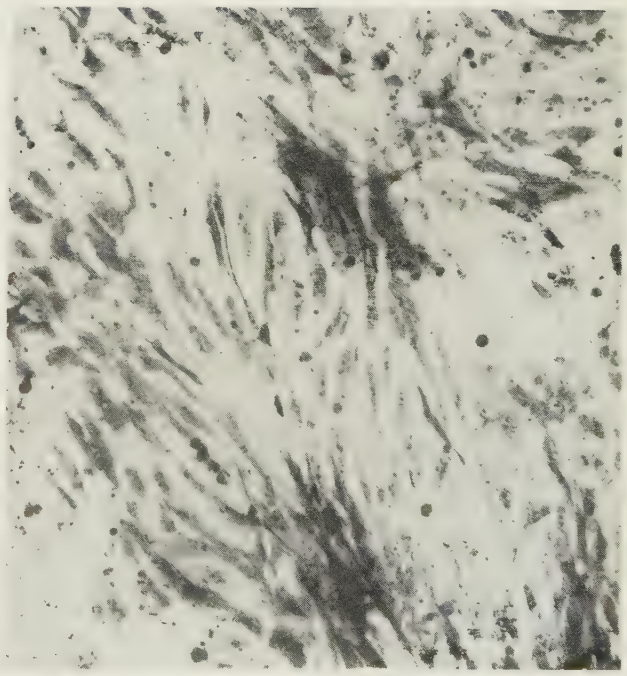
6 – CELLULES D'UNE CULTURE INFECTEE DEPUIS 60 JOURS (Gross^{t} = 880)

Il s'agit de cellules qui, bien qu'assez différentes de la cellule précédente et en particulier dépourvues de zone para-nucléaire, sont aussi très différentes des cellules non infectées. La substance mucoïde éosinophile est particulièrement bien visible entre les cellules.

7 – CULTURE TEMOIN NON INFECTEE 49 JOURS APRES LA MISE EN CULTURE (Gross^{t} = 180)

On peut la comparer au cliché n° 4 dont elle est le témoin, cultivé parallèlement.

On voit qu'elle est formée de fibroblastes.



CHAPITRE III

MULTIPLICATION DES CELLULES ET DU VIRUS DANS DES CULTURES SECONDAIRES NON CONFLUENTES

(Goldé et Vigier 1961)

Dans ce chapitre, notre objectif principal est de préciser les caractéristiques de la multiplication du virus, en particulier la durée exacte de la période d'éclipse, et de la multiplication des cellules dans des conditions optimum, ce qui constitue l'étape préliminaire indispensable aux études que nous effectuerons ultérieurement portant sur la cinétique de la synthèse du matériel viral et sur les modifications chimiques qui se produisent dans les cellules durant la multiplication du virus.

Par analogie avec les conditions réalisées par Dulbecco (1952) pour titrer et étudier la croissance d'un virus cytodestructeur, toutes les expériences du chapitre précédent étaient faites sur des cultures où les cellules ne se multipliaient pas. Cependant, le fait que les repiquages aient favorisé à la fois la multiplication des cellules et la croissance du virus suggère que les conditions nécessaires à une multiplication active du virus de Rous doivent être différentes de celles nécessaires

à la multiplication des virus cytodestructeurs. Temin et Rubin (1959) ont en effet constaté que la multiplication du virus de Rous semble maximum quand on infecte des cellules non confluentes 24 heures après repiquage. C'est pourquoi, à partir de ce chapitre, toutes nos expériences ont été effectuées dans des conditions standard définies ci-dessous.

I - Matériel et Méthodes

Des cultures primaires confluentes sont repiquées 3 jours après la mise en culture de 2 à 3 embryons. La suspension cellulaire est ensemencée dans le milieu 7111 (chapitre I) à raison de 500.000 cellules par boîte de Pétri. Le milieu d'entretien, constitué par le milieu 721 (7 parties de "199", 2 parties de sérum de veau, 1 partie d'extrait embryonnaire de veau), est renouvelé tous les 2 jours.

La méthode de titrage est la même que celle utilisée précédemment, c'est-à-dire qu'on compte les pocks produits sur la chorio-allantoïde d'oeufs embryonnés.

Dans la majorité des expériences, on a utilisé des suspensions de virus partiellement purifiées (chapitre I), préparées à partir d'extraits bruts de la tumeur C 845 de Bryan ou à partir de milieux de cultures riches en virus. Leurs titres sont compris entre $10^{6,7}$ et $10^{7,3}$ UP/ml. Le temps moyen d'inactivation thermique du virus semi-purifié dilué dans le milieu 721 est de 150 mn à 37°.

Conditions expérimentales

24 heures après repiquage, 60 à 100% (300.000 à 500.000) des cel-

lules ensemencées sont fixées et recouvrent environ le quart de la surface de chaque boîte. On infecte les cellules à ce moment; le fait qu'elles ne sont pas confluentes leur permet de se multiplier activement pendant les premiers jours qui suivent l'infection.

Si on admet que la croissance est exponentielle, le temps de génération moyen, ou temps de doublement en heures se calcule d'après la formule =

$$Tg = \frac{t_2 - t_1}{m}$$

où

$$m = \frac{\log.n_2 - \log.n_1}{0,30} \quad (\text{car } n_2 = n_1 \times 2^m)$$

n_1 et n_2 étant le nombre des cellules aux temps t_1 et t_2 et m le nombre de génération entre ces deux temps.

Les multiplicités d'infection sont comprises entre 2 et 0,001 UP/cellule. La durée des expériences n'a pas dépassé une semaine.

Le matériel à titrer est formé par le virus libre et les centres infectieux. Dans le chapitre précédent, on titrait le virus libre, c'est à dire le virus présent dans le milieu et le virus élué par lavage des cellules, et le virus total, qui était la somme du virus libre et du virus lié aux cellules.

Etant donné que les quantités de virus élué par lavage et le virus lié aux cellules sont beaucoup plus faibles que celle du virus libéré dans le milieu durant la première semaine qui suit l'infection, ce qui a été confirmé par Prince en 1960, nous n'avons titré que le virus contenu dans le milieu nutritif au cours de toutes les expériences décrites à partir de ce chapitre.

II - Expériences

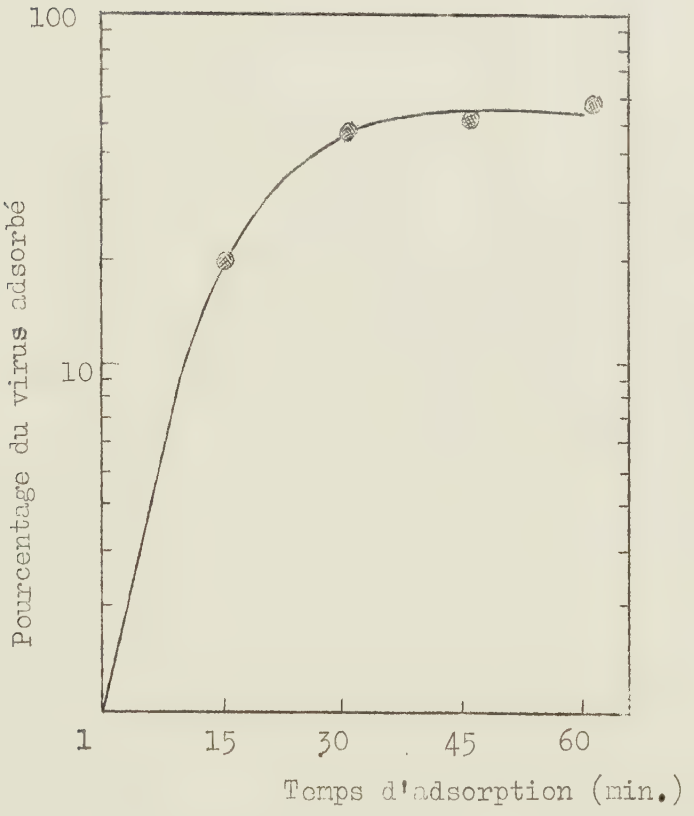
1 - Adsorption du virus

Avant d'entreprendre les expériences, on a déterminé le volume et le temps d'adsorption optimum.

Sur la base des résultats obtenus par Temin et Rubin (1959), on a choisi un volume d'inoculum viral de 0,01 ml par centimètre carré de surface du flacon, ce qui correspond à un volume de 0,2 ml par boîte de 6 cm de diamètre contenant 300.000 à 500.000 cellules. Dans ces conditions, on détermine le temps d'adsorption optimum en effectuant l'expérience suivante : on infecte une série de cultures faites dans les conditions standard avec 3.000 UP de virus en suspension dans 0,2 ml par boîte. L'inoculum viral est prélevé, à raison de 2 à 3 boites par temps, après 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes, 60 minutes, 100 minutes, et 120 minutes, de contact avec les cellules. Les résultats sont représentés dans la figure 8. L'allure de la courbe est la même que celle obtenue par Temin et Rubin (1958) et Prince (1960) et l'on voit qu'il y a d'abord une adsorption rapide suivie d'un fort ralentissement. Le maximum de la fixation qui est dans cette expérience de 60%, est atteint entre 45 et 60 minutes. C'est pourquoi toutes nos expériences sont effectuées après avoir infecté les cellules pendant 1 heure avec 0,2 ml de suspension virale. On a dans ces conditions une adsorption qui varie suivant les expériences de 50 à 70% du virus contenu dans l'inoculum.

Figure 8

Adsorption du virus en fonction du temps de contact avec des fibroblastes embryonnaires repiqués depuis 24 heures.



Des cultures de fibroblastes embryonnaires de poulet repiqués depuis 24 heures dans des boîtes de Pétri (conditions standard) ont été infectées à raison de 3.000 U.P. de virus en suspension dans 0,2 ml par boite. L'inoculum viral a été prélevé après 15, 30, 45 et 60 minutes de contact avec les cellules et titré selon la méthode standard. Les résultats sont exprimés en pourcentages de la quantité de virus adsorbé par rapport à la quantité de virus présente dans l'inoculum primitif.

II - Multiplication du virus et des cellules aux multiplicités les plus élevées.

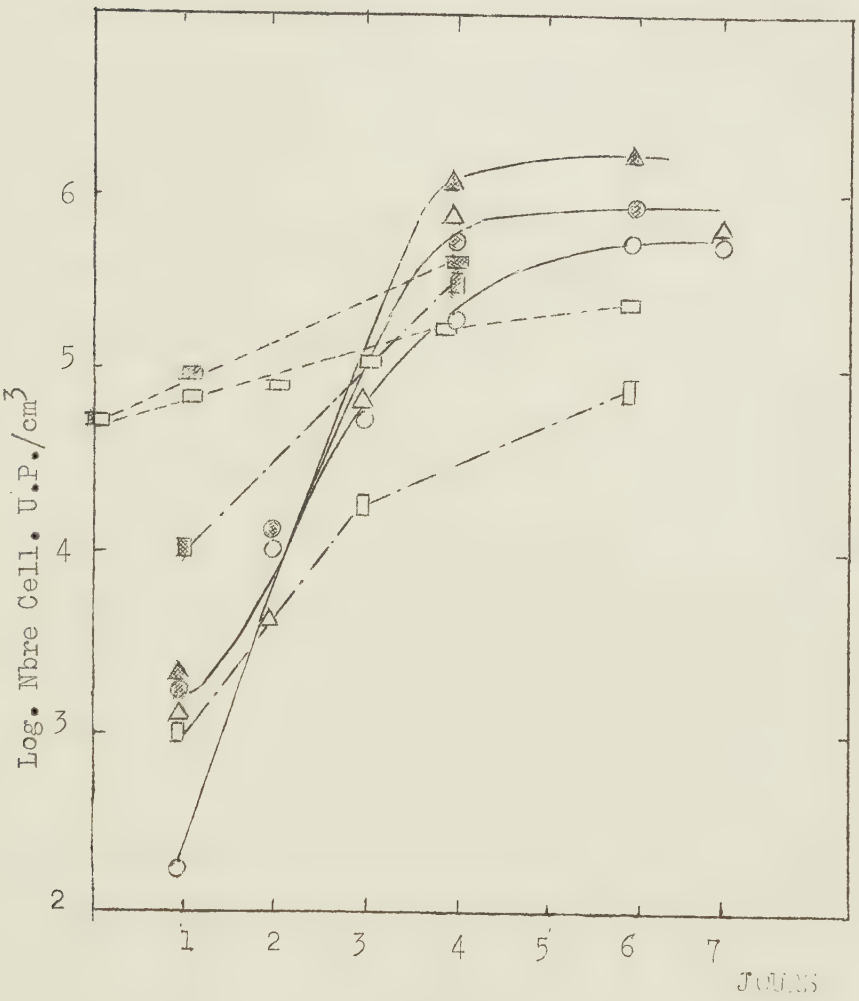
L'efficacité d'adsorption du virus étant optimum, on a réalisé une série d'expériences dans lesquelles la multiplicité d'infection doit permettre d'infecter toutes les cellules sensibles.

On a infecté 3 séries de cultures différentes à des multiplicités de 0,2 UP, 1 UP et 2 UP par cellule ; on a compté le nombre total de cellules, et titré le virus et les centres infectieux dans deux expériences (0,2 et 2 UP/cell.), et seulement le virus libre dans une expérience (1 UP/cell.) tous les jours pendant une semaine après infection.

On voit dans la figure 9, que les courbes de croissance ont le même aspect général aux 3 multiplicités, les variations étant dues aux différences qui existent entre les séries de cultures effectuées à partir d'embryons différents, problème que nous discuterons dans la dernière partie du chapitre. L'infection est suivie d'une diminution rapide du titre du virus puisque le virus présent à 24 h. dans deux des expériences, ne représente pas plus de 2% du virus adsorbé. (La durée exacte de la période d'éclipse sera déterminée au cours d'expériences ultérieures). Le titre du virus augmente ensuite logarithmiquement jusqu'au 4e jour, à partir duquel il reste stable jusqu'à la fin des expériences. Ce plateau, qui correspond comme nous l'avons vu dans le chapitre II, à un équilibre entre la production et l'inactivation thermique du virus, coïncide avec l'arrêt de la multiplication des cellules de la culture. Le titre atteint est de $10^{5,3}$ à 10^{6} UP/ml, soit 0,4 à 4 UP par cellule. Si l'on tient compte de l'inactivation thermique (formule de Rubin, 1955) on trouve une production de 4 à

Figure 9

Multiplication du virus et des cellules en fonction du temps dans des cultures secondaires infectées à des multiplicités supérieures à 0,1 UP/cellule



Quatre séries de cultures, contenant 5.10^4 cellules par ml au moment de l'infection ont été infectés à 3 multiplicités différentes. Les cellules totales, les centres infectieux et le titre du virus ont été déterminés tous les jours jusqu'à 7 jours dans 2 séries infectées avec 0,2 UP et 2 UP/cellule. La multiplication du virus seule a été déterminée dans 2 séries infectées avec 1 UP/cellule.

Les courbes en traits pleins représentent la multiplication du virus aux multiplicités de 0,2 UP/cell. (▲), 1 UP/cell. (△ ●) et 2 UP/cell. (○).

Les droites représentent la croissance des centres infectieux aux multiplicités de 0,2 UP/cell. (▩) et 2 UP/cell. (▯) et des cellules totales (▩ 0,2 UP/cell.) (▭ 2 UP/cell.) Les résultats sont exprimés en log. du nombre des cellules ou des unités pocks de virus par ml de milieu.

40 UP/par cellule et par jour.

Le nombre des centres infectieux déterminé 24 heures après infection ne représente que 1 à 10% du nombre total des cellules (figure 9). On voit que ce nombre augmente jusqu'à 4 jours beaucoup plus rapidement que le nombre total des cellules, et atteint au moment du palier d'équilibre, 30 à 100% suivant les expériences, sans que la multiplicité puisse être mise en cause pour expliquer ces différences. Ce point sera particulièrement discuté dans le dernier paragraphe du chapitre.

Afin de voir si la production peut être augmentée par des repiquages successifs, on a entretenu une série de cultures infectées à des multiplicités supérieures à 0,1 UP/cellule pendant plusieurs semaines. On a compté les cellules et titré le virus à divers moments, ce qui nous a permis de calculer la production virale par cellule et par jour en appliquant la formule de Rubin. Les résultats figurent dans le tableau 7. La stabilité de la production totale par culture signifie que le nombre des cellules productrices de virus, qui est dans chacune des séries de culture inférieure à 100%, est constant; par conséquent, la production moyenne par cellule et par jour est constante pendant 1 mois. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Prince (1960), et suggère que les relations cellule-virus sont fixées dès l'infection initiale. Cependant, dans les cultures âgées de 36 jours et 40 jours, la production a tendance à augmenter, ce qui doit correspondre non pas à une augmentation du nombre des centres infectieux, mais comme on l'a vu dans le chapitre précédent, à un accroissement de la taille des cellules. La corrélation entre la taille des cellules et leur production a été observée aussi dans les cellules humaines ou

Tableau 7

Stabilité de la production du virus par cellule et par jour au cours des repiquages des cultures infectées avec 0,1 à 0,5 UP/ Cellule.

	jours après l'infection	Nombre de repiquages	Temps depuis le dernier repiquage (jours)	Titre du virus pour 10^5 cell. log. des UP.	Production par cellule et par jour. Nbre d'U.P.
N. 83	8	1	2	5,50	20
	31	3	10	5,70	30
	40	3	19	6,10	80
N. 84	4	0	4	5,85	45
	6	1	2	5,80	40
	22	2	12	5,90	50
	36	4	6	6,30	140
N. 86	7	1	5	5,10	8
	20	3	5	5,40	16

Le premier repiquage a été effectué alors que le plateau d'équilibre entre la production et l'inactivation thermique du virus était atteint et que les cellules étaient confluentes. On a calculé la production en unités pocks, par cellule et par jour, en appliquant la formule de Rubin (1955, chapitre II). On a considéré un temps moyen d'inactivation thermique de 150 minutes.

---

de rein de singe infectées par le virus de la poliomyélite (Dunnebacke et Reaume, 1958).

Il ressort de ces premières expériences que la multiplication du virus dans les cellules infectées 24 heures après repiquage est beaucoup plus rapide que dans les cultures primaires âgées de 2 à 3 jours, et que le nombre maximum des cellules productrices de virus est atteint en quelques jours sans qu'il soit nécessaire de repiquer les cultures. De plus, aux multiplicités supérieures à 0,1 UP/cellule, toutes les cellules sensibles semblent être infectées. Cette particularité nous a conduite a étudier la multiplication du virus et des cellules en fonction de la multiplicité d'infection.

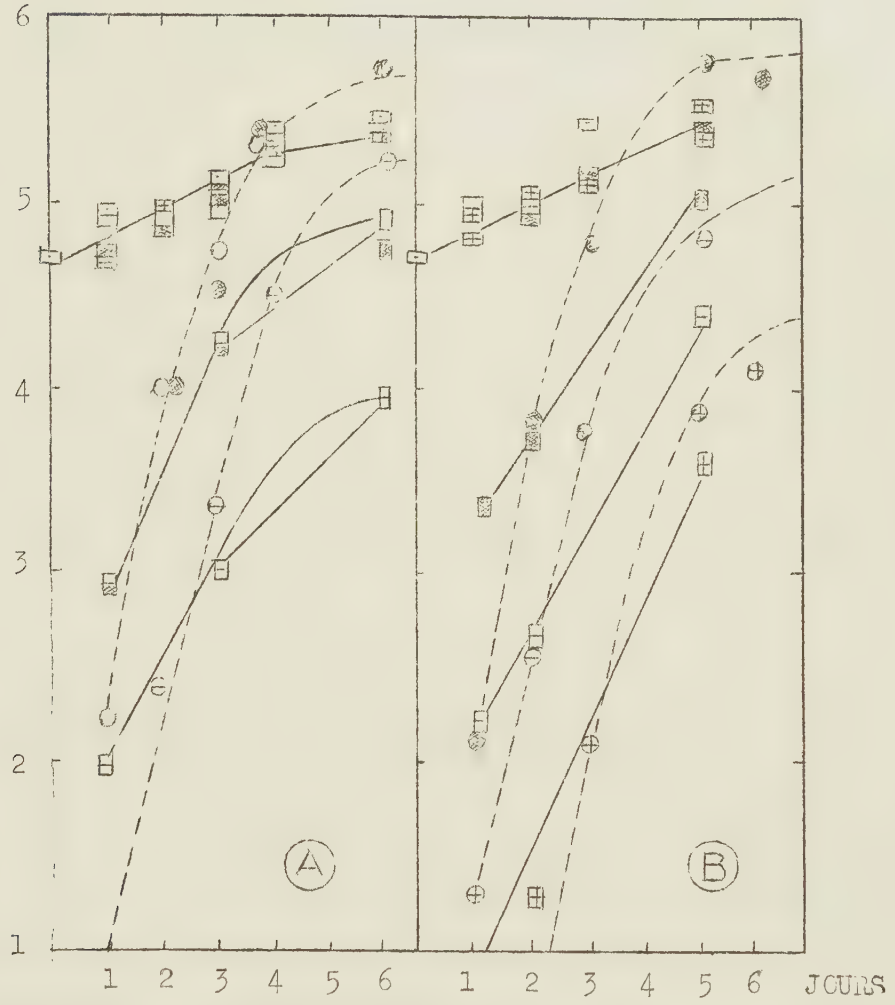
III - Multiplication du virus et des cellules en fonction de la multiplicité d'infection

On a effectué deux séries d'expériences (A) et (B) (figure 10) dans lesquelles chaque série, formée de cultures secondaires issues des mêmes cultures primaires, est divisée en plusieurs lots qu'on infecte à des multiplicités différentes ; 2 UP, 0,1 UP, 0,01 UP et 0,001 UP/cell. On y suit la multiplication des cellules, du virus et des centres infectieux pendant 6 jours.

On voit qu'aux multiplicités inférieures à 0,1 UP/cell., le titre du virus est proportionnel à la multiplicité d'infection ; par conséquent, les courbes de croissance sont parallèles. Le nombre des centres infectieux est aussi proportionnel à la multiplicité dans l'exp. (A); dans l'expérience

Figure 10

Multiplication du virus et des cellules en fonction de la multiplicité d'infection



Deux séries de cultures (A) et (B) ont été infectées dans les conditions standard à 4 multiplicités différentes. On a déterminé pour chacune le nombre total des cellules, le nombre des centres infectieux et le titre du virus libéré dans le milieu, tous les jours durant 6 jours. Les droites en traits pleins représentent le nombre total des cellules (rectangles horizontaux) et les centres infectieux (rectangles verticaux). Les courbes en traits discontinus représente la multiplication du virus.

Multiplicités : 2 UP/cell. (cell.totales) (centres infectieux) (virus)
0,1 UP/cell. " " "
0,01 UP/cell. " " "
0,001UP/cell. " " "

Les résultats sont exprimés en log. du nombre des cellules et du nombre d'U.P. de virus par ml de milieu.

(B) leur nombre augmente plus rapidement aux faibles multiplicités. Le plateau d'équilibre entre la production et l'inactivation thermique est atteint le même jour, quelle que soit la multiplicité d'infection. Cependant, le titre du virus dans les milieux des cultures infectées aux plus faibles multiplicités est plus élevé que celui auquel on pouvait s'attendre, sur la base de la proportionalité observée entre la multiplicité et le titre durant la période de multiplication. Comme dans les expériences de la figure 7, on n'observe aucune augmentation du nombre des centres infectieux ou du titre du virus quand on passe de 0,1 UP à 2 UP/cell. Ceci est particulièrement mis en évidence quand on établit la courbe du pourcentage des centres infectieux à 24 heures en fonction de la multiplicité initiale d'infection (figure 11).

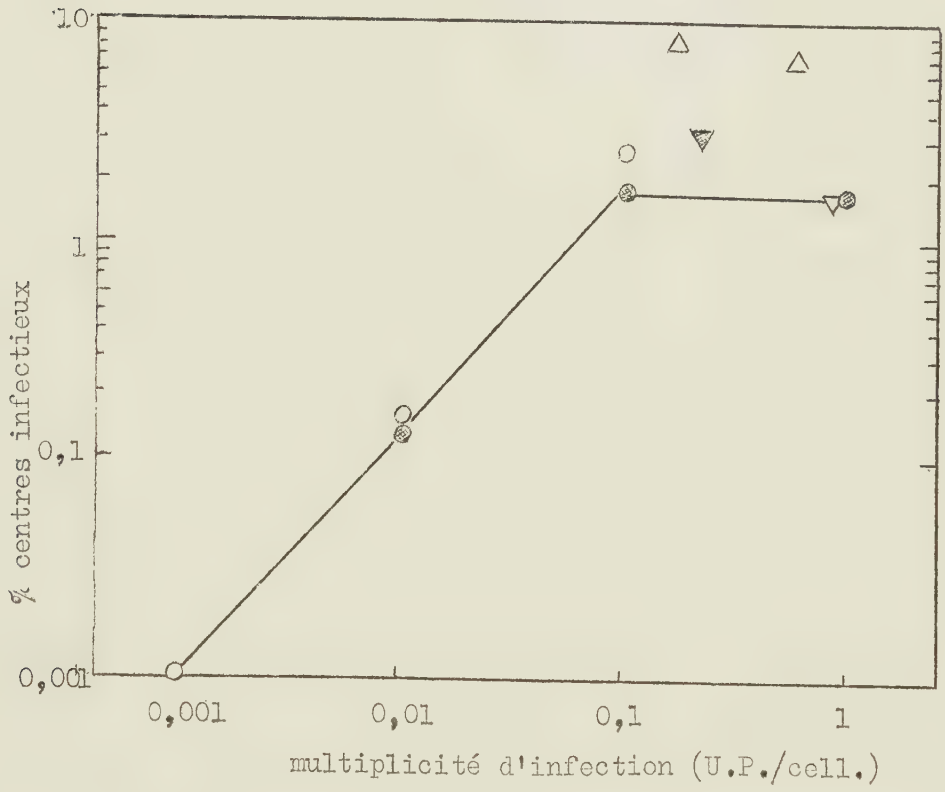
IV - Détermination de la durée de la période d'éclipse

Pour déterminer la durée de la période d'éclipse, nous avons utilisé le fait que toutes les cellules sensibles sont infectées à partir de la multiplicité de 0,1 UP/cell. En effet, ceci permet de distinguer les particules infectieuses résiduelles, non éliminées par le lavage des cellules et dont le titre est proportionnel à la dose initiale quelle qu'elle soit, des particules nouvellement formées et libérées, et dont le titre n'est proportionnel à la dose initiale qu'aux multiplicités inférieures à 0,1 UP/cell.

Dans une premières expérience, des lots de cultures identiques sont infectés à des multiplicités de 2 UP, 0,2 UP, 0,02 UP et 0,002 UP par cellule. Après l'infection, les cultures sont lavées avec 6 ml de M 721 qu'on

Figure 11

Pourcentages des centres infectieux par rapport au nombre total des cellules en fonction de la multiplicité d'infection, 24 heures après infection.



Ce sont les expériences A (●) et B (○) de la figure 10. Les triangles représentent les résultats d'autres expériences réalisées dans les mêmes conditions. Les cellules infectées ont été inoculées après avoir été lavées durant 5 heures dans les conditions standard, afin d'éliminer tout le virus adsorbé.

élimine après 5 heures de contact avec les cellules ; dans ces conditions, la majorité du virus adsorbé qui ne pénètre pas dans les cellules s'élue spontanément, et le nouveau milieu 721 qu'on ajoute après lavage est titré 8 h., 16 h., 24 h., 32 h., 48 h., et 72 h., après l'infection. On voit dans la figure 12 qu'il existe une proportionnalité entre les multiplicités d'infection de 0,2 UP et 2 UP et les titres du virus à 8 h. et 16 h.; cela prouve qu'il s'agit du virus résiduel qui s'est inactivé thermiquement, comme le confirme le parallélisme entre les pentes des deux droites représentant les titres et la pente de la droite représentant l'inactivation thermique du virus standard. Par contre, à partir de 24 heures, cette proportionnalité entre le titre du virus et la dose initiale n'existe plus à ces deux multiplicités, ce qui démontre qu'il s'agit bien de la libération de nouvelles particules. A partir de ce moment, les titres du virus sont proportionnels aux multiplicités d'infection pour les doses inférieures à 0,2 UP/cell. On en déduit que les premières particules ont été libérées entre 16 h. et 24 heures.

Dans une seconde expérience dont les résultats figurent dans le tableau 8, les milieux ont été renouvelés complètement 12 h., 14 h. 30 min., 18 h. et 22 h. après l'infection et titrés, les titrages de 48 heures et 72 heures étant faits sur des milieux non renouvelés à partir de 24 heures. On voit que 12 h. et 14 h. 30 après l'infection, tous les titres sont proportionnels à la multiplicités initiale d'infection, y compris aux multiplicités 0,1 et 1 UP/cell.; les titres de ces deux lots ne deviennent identiques qu'à partir de 18 h. après l'infection ce qui démontre que le virus présent dans le milieu est du virus nouveau, et que les

Figure 12

Durée de la période d'éclipse déterminée d'après la croissance du virus en fonction de la multiplicité d'infection.

Quatre lots de cultures repiquées depuis 24 heures ont été infectés dans les conditions standard à 4 multiplicités différentes.

○ : 2 UP/cell.; ◍ 0,2 UP/cell.; ⊖ 0,02 UP/cell.; ⊕ 0,002 UP/cell.

la droite en pointillés qui se trouve en haut, à gauche, représente l'inactivation thermique à 37° du virus libre en suspension dans le milieu de culture.

Les résultats sont exprimés en log. du nombre d'unités pocks de virus par ml de milieu.

Tableau 8

Détermination de la durée de la période d'éclipse. Titres du virus dans les milieux de cultures en fonction du temps et de la multiplicité d'infection (log. UP/ml).

Multiplicité d'infection UP/cellule	heures après infection					
	12	14 1/2	18	22	48	72
1	3,10	2,35	2,05	2,35	3,85	N.T.
0,1	1,95	1,20	1,95	2,25	3,75	4,35
0,01	0,80	0,70	1,30	1,30	2,75	3,65
0,001	-	-	-	-	1,35	2,35

Le milieu nutritif a été changé complètement après les titrages de 12, 14 1/2, 18 et 22 heures.

A partir de 22 heures, il n'a plus été renouvelé pour les titrages de 48 et 72 heures.

N.T. = non titré
le signe - signifie qu'on est au-dessous de la limite de sensibilité de la méthode.

---

premières particules doivent être libérées entre 14 h. 30 et 18 h. Cependant le titre des milieux des cultures infectées avec 0,01 UP/cell. est plus élevé que celui auquel on pouvait s'attendre, compte tenu du titre trouvé à la multiplicité 10 fois supérieure; ceci suggère que les premières particules ont pû être libérées plus tôt, entre 12 heures et 14 heures.

On peut conclure des deux expériences que la durée de la période d'éclipse est, dans notre système, comprise entre 12 et 24 heures.

V - Le problème des centres infecticux

En 1958, Temin et Rubin constataient que le nombre des centres infectieux détectés quand les cellules infectées sont ensemencées sur des couches monocellulaires de fibroblastes tout de suite après l'infection, ne dépasse jamais 10% des cellules totales, quelle que soit la multiplicité initiale d'infection. Ils concluaient à ce moment que 10% des cellules au : maximum, sont sensibles à l'infection. Cependant, deux ans plus tard, Rubin (1960 a) montrait que toutes les cellules, ou du moins la plupart peuvent être infectées et détectées comme centres infectieux, à condition d'attendre un ou deux jours avant de les ensemencer pour les dénombrer. Il suggérait qu'un délai variable doit exister entre l'infection et le moment où les cellules infectées sont capables de libérer les particules infectieuses et de subir les altérations morphologiques qui aboutissent à la formation de foyers.

Comme on peut le voir dans les figures 9, 10 et 11 nos résultats sont comparables, c'est-à-dire que le nombre des centres infectieux détectés par inoculation des cellules sur la chorio-allantoïde 24 heures après infection, ne dépasse pas 10% des cellules totales, et atteint 30 à 100% à 4 jours dans les cultures infectées aux plus hautes multiplicités. L'augmentation des centres infectieux pourrait être due cependant à une infection secondaire par le virus libéré précocément ou par passage des particules d'une cellule à une autre cellule contigüe qui n'aurait pas été infectée initialement. C'est pour confirmer ou non cette hypothèse que nous avons réalisé l'expérience suivante où l'on titre les centres infectieux comparativement dans des cultures riches et pauvres en cellules, donc en

virus, les infections secondaires ayant plus de chances de se produire dans les premières que dans les secondes. Cette même expérience sera aussi utilisée dans le paragraphe suivant pour étudier comparativement la multiplication des cellules infectées et non infectées.

Processus expérimental

Trois jours après leur mise en culture, les cellules embryonnaires sont décollées et remises en suspension dans un volume connu de milieu M 7111. La suspension est divisée en deux lots identiques; le premier lot, gardé à 37° pendant 1 heure, ne sera utilisé, après ensemencement dans les conditions définies ci-dessous pour les cultures infectées, que pour suivre la multiplication des cellules (paragraphe suivant). Le second est employé après infection pour déterminer à la fois la multiplication cellulaire totale et l'évolution du nombre des centres infectieux. On infecte, pendant 1 heure à 37°, 5.10^6 cellules en suspension dans 1 ml de milieu contenant 5.10^6 UP de virus : on a ainsi une multiplicité de 1 UP/cellule. Après l'infection, on lave les cellules deux fois de suite et on les remet en suspension dans le milieu 7111. Après les avoir comptées, on les ensemence dans des boîtes de Pétri à 3 concentrations différentes : le lot (a) comprend les cultures ensemencées avec 500.000 cellules par boîte (conditions standard), le lot (b) avec 100.000 cellules par boîte et le lot (c) avec 20.000 cellules par boîte. On compte dans chacun des lots, le nombre moyen de cellules contenues dans 2 boîtes par temps et on titre les centres infectieux 1 jour, 4 jours et 7 jours après l'infection. Les résultats figurent dans le tableau 9. On voit que le nombre des centres infectieux est le

Tableau 9

Pourcentages des centres infectieux en fonction du temps après infection (1 UP/cell.) et du nombre des cellules par boîte de Pétri.

Nombre de cellules ensemencées par boîte	Jours après infection et ensemencement des cellules		
	1	4	7
5×10^5 (a)	1% (3×10^5) (-)	17% ($1,7 \times 10^6$) (+)	43% ($1,5 \times 10^6$) (+)
1×10^5 (b)	N.T. ($7,2 \times 10^4$) (-)	16% ($2,8 \times 10^5$) (-)	46% ($6,5 \times 10^5$) (±)
2×10^4 (c)	0,5% (9×10^3) (-)	21% (5×10^4) (-)	35% ($1,2 \times 10^5$) (-)

Les cellules ont été infectées en suspension à une multiplicité de 1 UP par cellule, et ensemencées à 3 concentrations différentes (a) (b) (c) dans des boîtes de Pétri (6 ml. par boîte).

Entre parenthèses, sous les chiffres des pourcentages des centres infectieux, figurent les nombres de cellules par boîte (moyenne de 2 boîtes). Les signes (-) désignent les cultures non-confluentes, (±), les cultures à peine confluentes et (+), les cultures confluentes.

N.T. = non titré.

---

le même dans tous les lots, à chaque temps. Si les conditions de culture permettent éventuellement aux infections secondaires de se produire dans les lots (a), où les cellules confluent vers le 3e ou le 4e jour, il est très peu probable que des infections secondaires se soient produites dans les lots (b) et (c) où les cellules confluent très tardivement ou pas du tout. Par conséquent, le fait qu'il y a un nombre identique de cellules

productrices de virus 7 jours après l'infection dans les cultures riches confluentes et pauvres non confluentes montre qu'elles représentent bien les cellules infectées au cours de l'infection initiale.

VI - Caractéristiques de la multiplication des cellules infectées et non infectées

Dans les expériences de la figure 9, le nombre total des cellules augmente de 4 à 13 fois durant la période de multiplication du virus, ce qui fait, si on admet que la croissance est logarithmique, un temps moyen de génération compris entre 26 et 48 heures. A partir de 4 jours, la multiplication est pratiquement arrêtée et l'examen des cultures montre que cet arrêt correspond à la confluence des cellules. Ceci suggère que l'inhibition de la multiplication par contact des cellules infectées entre elles, et qui survient normalement dans les cultures de cellules non infectées (Weiss, 1953 - Abercrombie et Heaysman 1953) se produirait aussi dans les cultures de cellules infectées. Pour vérifier ce fait on a étudié comparativement les caractéristiques de la multiplication des cellules dans des cultures infectées et non infectées, ensemencées à des concentrations différentes. C'est la même expérience que celle qui a été décrite dans le paragraphe précédent. Le lot des cellules non infectées est réparti dans les mêmes conditions, aux 3 concentrations (a) 500.000 cell./ boîte, (b) 100.000 cell./boîte et (c) 20.000 cell./boîte. On compte le nombre total des cellules dans les cultures infectées et non infectées 1 jour, 4 jours, et 7 jours après l'ensemencement, qui correspond aussi à l'infection, ce qui permet de calculer le temps moyen d'une génération

dans chaque lot. Les résultats sont représentés dans le tableau 10 et la figure 13. De 1 à 4 jours, les cellules des cultures (a) se multiplient activement et la vitesse de multiplication des cellules infectées est en général égale ou inférieure à celle des cellules non infectées à l'exception des expériences de la figure 13 où elle est supérieure. Les cellules infectées et non infectées des lots (b) et (c) ont une vitesse de multiplication plus faible qu'à la concentration supérieure (a) (temps de génération plus long) (tableau 10) ce qui est sans doute dû à une insuffisance

Tableau 10

Durée moyenne d'une génération (en heures) dans les cultures de cellules infectées (1 UP/cell.) et non infectées en fonction de la période de croissance et de la concentration cellulaire.

Cellules	Période de temps après le repiquage						
	1 à 4 jours					4 à 7 jours	
non infectées	30	34	36	38(c)	59(b)	60(b)	72 90(c)
infectées	51	40	42	60(c)	79(b)	st.(b)	st. 90(c)

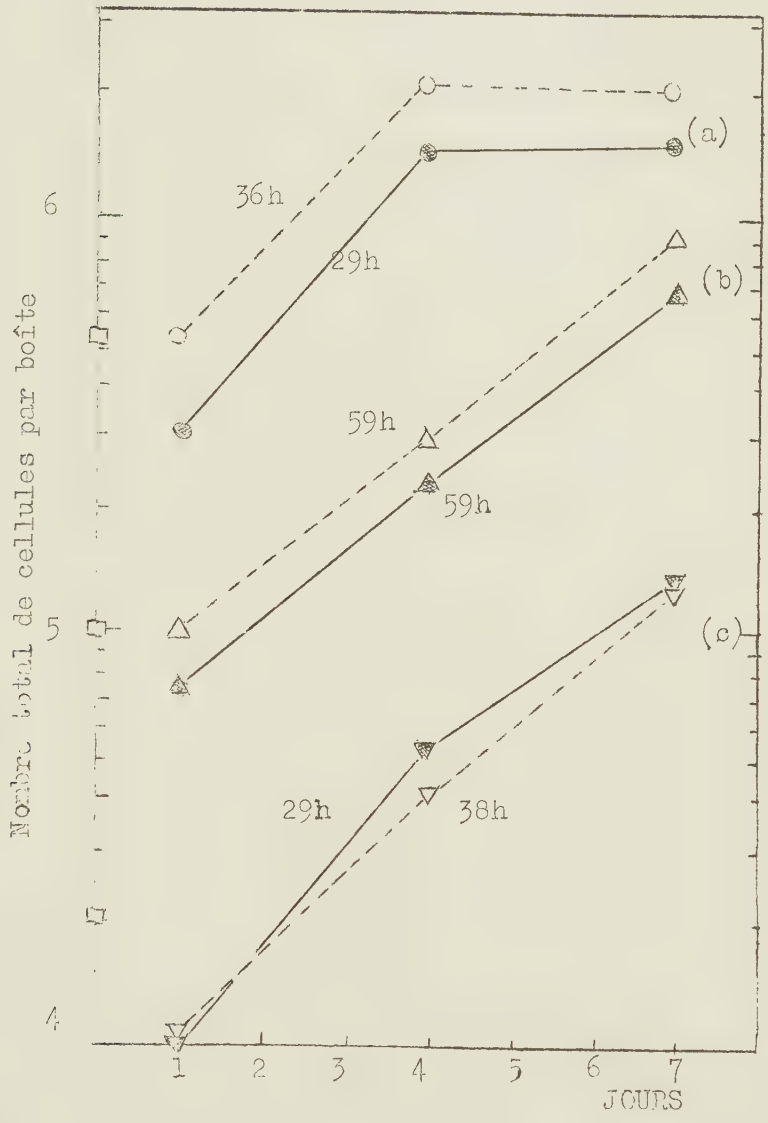
Les cultures, infectées et non infectées ont été ensemencées dans des boîtes de Pétri dans les conditions standard (500.000 cellules par boîte), à l'exception des cultures (b), qui ont été ensemencées à raison de 100.000 cellules par boîte, et des cultures (c) qui ont été ensemencées à raison de 20.000 cellules par boîte.

st. = stationnaire

Les durées d'une génération dans les cultures infectées et non infectées repiquées parallèlement à partir d'une même culture primaire, se trouvent sur la même colonne verticale.

Figure 13

Multiplication des cellules infectées et non infectées en fonction du nombre de cellules ensemencées et en fonction du temps de culture



Les cellules ont été infectées en suspension à une multiplicité de 1 UP par cellule, et ensemencées à 3 concentrations différentes :

(a) = 500.000 cell./boîte
(b) = 100.000 cell./boîte
(c) = 20.000 cell./boîte.

Une suspension de cellules non infectées, issues des mêmes cultures primaires que la suspension précédente, a été ensemencée parallèlement dans les mêmes conditions. Les nombres représentent la durée moyenne d'une génération cellulaire en haure. Le nombre moyen des cellules par boîte à 1 j., 4 j., et 7 j., aux différentes concentrations a été déterminé d'après le nombre total des cellules contenues dans 2 ou 3 boîtes.

du milieu en éléments nutritifs à laquelle sont plus sensibles les cultures pauvres en cellules. A partir du 4e jour, les cultures des lots (a) d'une part, et des lots (b) et (c) d'autre part, se conduisent différemment. En effet, alors que la confluence des cellules infectées et non infectées des cultures (a) provoque un arrêt de leur croissance, les cellules des cultures (b) et (c) continuent à se multiplier jusqu'à 7 jours, étant donné que la confluence n'est pas atteinte dans les limites de l'expérience. Ces résultats démontrent que dans nos conditions de culture, l'inhibition de la multiplication par contact entre les cellules se produit aussi bien dans les cultures infectées que non infectées.

Discussion

Les courbes de multiplication du virus et des cellules infectées dans nos expériences sont comparables à celles rapportées par Temin et Rubin (1959), Rubin (1960 a-b) et Prince (1960 a). Cependant dans les expériences de Prince, la multiplication du virus est plus rapide et le plateau d'équilibre de la production est atteint dès le 2e jour, ce qui semble dû à la plus grande résistance thermique du virus utilisé par cet auteur. La durée de la période d'éclipse est aussi similaire à celle rapportée par les auteurs cités précédemment. La plus courte durée de 8 à 9 heures trouvée par Prince pourrait s'expliquer par une différence dans l'état physiologique des cellules au moment de l'infection, problème important

et que nous étudierons particulièrement dans le chapitre V. On a vu que la multiplication du virus résulte de deux processus ; d'abord la production du virus par les cellules infectées, ensuite la multiplication des cellules. En dépit de ce double mécanisme de croissance, qui est une conséquence de la propriété du virus de Rous à infecter les cellules sans inhiber leur mitose et sans les détruire, comme le font la plupart des autres virus bactériens ou animaux, il semble que l'on puisse dire qu'il y a un cycle d'infection unique aux multiplicités suffisantes pour infecter toutes les cellules sensibles, puisqu'elles sont toutes infectées initialement. En effet, nos résultats suggèrent que l'accroissement progressif du nombre des centres infectieux au cours de la période initiale de la multiplication du virus est dû, non pas à des infections secondaires, mais à un délai variable de libération des particules infectieuses par les cellules infectées initialement. Ceci a été confirmé récemment par Vogt et Rubin (1961) grâce à la coloration de l'antigène viral par les anticorps fluorescents. On ne peut augmenter la vitesse de libération du virus ni en utilisant des cultures pures de fibroblastes, ni en synchronisant les cellules (Temin et Rubin 1958).

Le plateau d'équilibre coïncide avec un arrêt de la multiplication cellulaire qui est, nous l'avons vu, provoqué par la confluence. Ce dernier fait paraît être en contradiction avec les observations d'Abercrombie, Heaysman et Karthauser (1957); en effet, ces auteurs, après avoir constaté que des cellules issues de deux fragments de tissus normaux cultivés côte à côte, cessent de se multiplier quand elles entrent au contact l'une de l'autre, par suite de l'inhibition de leurs mouvements, observaient par

ailleurs que cette inhibition était beaucoup plus réduite et même inexistante entre cellules normales et cancéreuses. D'autre part, Rubin (1960 a) constatant que les colonies de cellules de Rous incluses dans l'agar et se développant sur une couche de fibroblastes non infectés forment des couches pluricellulaires, concluait que l'inhibition de la croissance par contact ne se produit pas. Cependant, dans les deux cas les conditions expérimentales sont très différentes des nôtres et il est possible que l'inhibition ne puisse se produire qu'entre cellules néoplasiques étalées sur le verre et cultivées en milieu liquide.

Toutes les altérations morphologiques observées dans les cultures infectées sont identiques à celles décrites dans le chapitre précédent et la conversion des fibroblastes en cellules rondes apparaît très précocément aux plus hautes multiplicités.

Le fait que toutes les cellules soient infectées à la multiplicité de 0,1 UP/cellule soulève le problème discuté par Rubin (1960 a) et par Prince (1960) du nombre des particules infectieuses (P.I.) qui correspond à une unité pock. Si l'on admet que le plateau du nombre des centres infectieux détectés à 24 heures dans la figure 11, correspond à l'infection de toutes les cellules sensibles, on peut déduire graphiquement la multiplicité d'infection pour laquelle 63% de ce nombre est atteint, et qui correspond donc à 1 particule par cellule (distribution de Poisson). On trouve ainsi que 0,06 UP = 1 P.I. soit 1 UP = 17 particules infectieuses pour une adsorption de 100 % et 25 à 30 P.I. si on considère une adsorption moyenne de 60 à 70%. Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus par Rubin (1960 a)

qui calcule que 1 UP = 10 P.I. en considérant 100% d'adsorption. Par contre, Prince (1960 a) considérant une adsorption de 50%, obtient une valeur de 10 particules par UP de virus standard et 5 particules par UP de virus appartenant à la souche à haut titre de Bryan. Cette différence peut être partiellement expliquée par les erreurs des méthodes employées, mais également par des différences entre les systèmes cellulaires utilisés. Toutes les cellules des cultures effectuées par Prince sont en effet infectées avec 0,5 UP/cellule pour le virus standard, et avec 1 UP/cell. pour la souche de Bryan.

Enfin, un dernier point à considérer est la raison pour laquelle le nombre maximum des cellules productrices de virus varie, par culture, de 30 à 100% suivant les expériences.

On peut penser que les cellules non productrices de virus dans les cultures où la multiplicité est suffisante pour infecter toutes les cellules sensibles sont celles qui n'ont pas été infectées initialement, par suite d'une interférence entre les particules actives et inactivées thermiquement présentes dans l'inoculum (Temin et Rubin, 1958). Si cette hypothèse était correcte, les repiquages successifs devraient permettre aux infections secondaires de se produire et l'augmentation du titre du virus traduirait l'accroissement du nombre des centres infectieux. Le tableau 7 montre qu'il n'en est rien , et que la production totale des cultures au cours des repiquages reste constante. La fraction de la population cellulaire qui ne produit pas de virus semble donc résistante aux surinfections, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Prince en 1960.

Par contre, nos résultats sont compatibles avec l'existence d'une interférence entre le virus de Rous et le virus de la lymphomatose. Rubin (1960 d, 1961), Friesen et Rubin (1961) ont en effet démontré que la résistance de certaines cultures à l'infection par le virus de Rous est due à la présence du virus de la lymphomatose qui peut se multiplier dans les cellules sans les détruire. Bien que la basse fréquence d'apparition de la lymphomatose dans la souche de poules que nous utilisons (1%) suggère que l'élevage est peu contaminé, il est possible que le virus de la lymphomatose soit néanmoins présent dans un certain nombre d'embryons. La mise en culture des cellules embryonnaires favoriserait alors la multiplication du virus, comme le montrent les observations faites au microscope électronique par Benedetti et Bernhard (1958). Dans ces conditions, le virus de la lymphomatose peut se multiplier parallèlement au virus de Rous, provoquant une résistance constante d'une partie de la population cellulaire à une infection secondaire, en dépit des repiquages.

Enfin, des résultats obtenus in vitro par Prince (1960) et Temin (1962, Exp. non publiées) suggèrent que le virus de Rous peut infecter des cellules de poulet et les convertir en cellules néoplasiques non productrices de virus; ceci est en accord avec les expériences effectuées in vivo par Bryan et coll. (1955), Prince (1959), dont nous avons parlé dans l'historique du virus de Rous, et qui montrent qu'on peut obtenir dans certaines conditions des tumeurs entièrement dépourvues de virus. La présence dans nos cultures d'un certain nombre de cellules néoplasiques non productrices de virus peut passer alors inaperçue pour peu qu'elles soient, comme les cellules obtenues par Prince, non greffables sur la chorio-allantoïde. Elles se conduiraient ainsi comme des cellules non infectées et pourraient

constituer une partie des cellules non détectées comme centres infectieux. Cette indépendance apparente entre la conversion morphologique et le caractère néoplasique d'une part, et la production du virus infectieux d'autre part, a été observée aussi dans le cas des cellules de hamster ou de souris infectées par le virus du polyome. Ceci pose un problème important qui est celui du rôle du génome viral, et de sa persistance éventuelle sous une forme intégrée dans les cellules converties par un virus cancérigène en cellules néoplasiques non productrices de virus. On en discutera en détails dans la dernière partie de ce travail.

CHAPITRE IV

ACTION DES INHIBITEURS DE LA SYNTHESE DES ACIDES NUCLEIQUES ET DES PROTEINES SUR LA MULTIPLICATION DES CELLULES ET DU VIRUS

I - ACTION DE BASES PYRIMIDIQUES FLUOREES, 5-FLUORO-URACILE (FU) ET 5-FLUORO-DESOXYURIDINE (FU D R) SUR LA SYNTHESE DES ACIDES NUCLEIQUES

1 - Introduction

On a dit, dans l'introduction, que l'application aux virus animaux de la méthode d'extraction des acides nucléiques mise au point par Gierer et Schramm, et Fraenkel-Conrat (1956) a permis de démontrer que l'acide nucléique, ARN ou ADN, ainsi extrait de la particule virale porte toute l'information génétique nécessaire à la synthèse des nouvelles particules. Dans les cas, les plus nombreux, où les suspensions virales ne peuvent être obtenues dans un état de pureté suffisant pour que l'on puisse procéder à leur analyse chimique directe, cette technique, appliquée aussi bien aux particules infectieuses elles-mêmes qu'aux cellules infectées, permet de préciser la nature de l'acide nucléique qui contient l'information du virus étudié ; elle permet, d'autre part, de démontrer que la période d'éclipse qui suit l'infection de la cellule correspond au temps pendant lequel le matériel viral, et

notamment l'acide nucléique viral est synthétisé (voir Herriott 1961), ce qui avait été déjà démontré par analyse chimique directe, par Hershey, Dixon et Chase (1953) dans le cas de E. coli infecté par le phage T_2.

En ce qui concerne le virus de Rous, pour lequel différentes observations morphologiques (Epstein et Holt, 1958) et cytochimiques (Goldé 1959, Chap. II) suggèrent que son matériel génétique est un ARN, toutes les tentatives d'extraction de l'acide nucléique sous une forme infectieuse, aussi bien à partir des particules virales qu'à partir des cellules infectées à haute multiplicité, ont jusqu'à présent échoué (Goldé, Huppert et Vigier 1960 - exp. non publiées - Weil, Bendich et Southam 1960). C'est pourquoi le problème de la nature de l'acide nucléique du virus de Rous ne peut être résolu que d'une façon indirecte, étant donné que l'impureté des suspensions virales ne permet pas d'en effectuer l'analyse chimique (Bather 1957). Dans cette perspective, nous avons réalisé une série d'expériences au cours desquelles on a inhibé spécifiquement les synthèses de l'ARN et de l'ADN cellulaires, et par conséquent la synthèse de l'acide nucléique viral, en incorporant dans les cellules infectées des bases pyrimidiques fluorées le 5 fluorouracile (FU) et la 5 fluorodesoxyuridine (FUDR). Cette action inhibitrice de FU et FUDR a fait l'objet de nombreuses études (voir revue par Hartman et Buchanan 1959) effectuées sur des cellules animales et bactériennes non infectées, dont nous allons résumer rapidement les résultats :

- le fluoro-uracile agit sur le métabolisme de l'ADN et de l'ARN. En effet, il inhibe rapidement la synthèse de l'ADN, d'où blocage des mitoses et de la multiplication cellulaire, en empêchant la formation de l'acide

thymidylique aussi bien dans les bactéries (Cohen et coll. 1958) que dans les cellules animales in vivo (Bosch et coll. 1958 - Danneberg et coll. 1958) et in vitro (Kaplan et Ben Porat 1960 - Simon 1960 - Rich et coll. 1960) A l'exception de quelques lignées de cellules de mammifères cultivées in vitro (Rich et coll. 1958) cette action inhibitrice de FU est renversée par l'addition simultanée de thymidine. D'autre part, FU agit sur le métabolisme de l'ARN cellulaire en s'y incorporant sous forme d'acide 5 fluoro-uridylique (Chaudhuri et coll. 1958 - Horowitz et Chargaff 1959) ce qui aboutit à la formation d'un ARN "frauduleux" synthétisant des protéines aberrantes, incompatibles avec la vie cellulaire normale. En particulier FU inhibe l'activité (voir Gros et Naono 1960) ou la synthèse (Horowitz et coll. 1960) de certaines enzymes dans des bactéries E. Coli cultivées dans un milieu nutritif le contenant. Cette action du fluoro-uracile sur l'ARN et les protéines semble plus lente que son action sur l'ADN, et n'est pas réversible par la thymidine (Kaplan et Ben Porat 1960). Aucun fait ne montre que cet analogue peut s'incorporer dans l'ADN, comme le font les dérivés bromés et iodés correspondant (Zamenhoff et coll. 1956, Dunn et Smith 1954).

- Quant à la fluorodésoxyuridine, c'est un inhibiteur puissant de la multiplication cellulaire; en effet, elle agit directement sur la synthèse de l'ADN en inhibant les réactions de méthylation qui aboutissent à la formation de la thymidine (Bosch et coll. 1958, Rich, Saslaw et Eidinoff 1960). Cohen et coll. (1958) ont démontré que le manque de thymine dans E. coli traité par FUDR provient de l'inactivation irréversible de la thymidylate synthétase.

Dans ces conditions, on voit que l'addition de l'un ou l'autre de ces dérivés dans le milieu des cultures de cellules infectées par un virus

animal doit permettre d'inhiber la synthèse de l'acide nucléique viral et par conséquent, d'identifier la nature de cet acide nucléique. C'est ainsi que la synthèse d'un virus dont le matériel génétique est un ADN, comme le virus de la vaccine, est inhibée par FUDR (Salzman 1960) tandis que la synthèse du virus de l'encéphalomyocardite murine (EMC - Sanders 1960) dont le matériel génétique est un ARN, n'est pas inhibée par FUDR mais est, par contre, inhibée par FU. Deux observations faites par Fairman (1959), Rich, Stonehill et Eidinoff (1960) semblent démontrer que le traitement par FU des cellules de poulet infectées par le virus de Rous ne réduit pas la production virale. En fait, nous allons voir au cours des expériences décrites dans ce chapitre, que l'action inhibitrice du fluoro-uracile dépend du moment où on le met au contact des cellules après l'infection.

De plus, l'addition de FU dans différentes conditions à différents moments de la période de multiplication du virus nous permet d'effectuer une étude cinétique de la synthèse du matériel viral.

II - Matériel et Méthodes

On a utilisé les conditions standard définies dans le chapitre précédent, c'est-à-dire que toutes les cultures secondaires, repiquées dans des boîtes de Pétri contenant en moyenne 500.000 cellules et 6 ml de milieu 721, ont été infectées 24 heures après repiquage avec 0,2 ml de suspension virale durant 1 heure. Les multiplicités d'infection étaient toutes comprises entre 0nl et 1 UP/cellule, ce qui a permis d'infecter toutes les cellules sensibles.

A chaque série de cultures infectées correspond une série de cultures non infectées, afin d'étudier l'action inhibitrice des dérivés fluorés sur la multiplication des cellules de poulet.

Les deux bases pyrimidiques fluorées, FU et FUDR ont été dissoutes dans le milieu synthétique "199" à raison de 1 mg/ml. On a ajouté le volume désiré de chaque solution au milieu nutritif de chaque culture. La thymidine et l'uracile, utilisées dans les expériences de réversion de l'inhibition, ont été dissoutes dans du "199" à raison de 2 mg ou 4 mg/ml.

Tous les milieux ont été renouvelés chaque jour afin de favoriser au maximum la multiplication des cellules et l'incorporation du dérivé étudié.

III - Expériences

On a étudié successivement :

A) l'action de doses croissantes de FU et FUDR sur la multiplication des cellules et du virus de Rous, les deux dérivés étant ajoutés dès la fin de la période d'adsorption du virus et laissés au contact des cellules jusqu'à la fin de l'expérience (3 jours).

B) la cinétique de la synthèse du matériel viral en inhibant la production des particules infectieuses par addition d'une dose constante (20 µg/ml) de FU à divers moments de la multiplication du virus ; on la laisse dans les cultures jusqu'à la fin de l'expérience.

C) l'action du FU sur la multiplication des cellules et du virus quand on le laisse au contact des cellules durant des temps limités.

D) la réversion de l'action inhibitrice de FU sur la multiplication des cellules et du virus, à l'aide d'uracile et de thymidine ajoutées en même temps ou après contact avec le dérivé fluoré.

A. ACTION DE DOSES CROISSANTES DE FU ET FUDR AJOUTEES AU MOMENT DE L'INFECTION.

Ces expériences ont pour but d'abord de préciser lequel des deux analogues inhibe la production des particules infectieuses; ensuite de déterminer la dose optimum du dérivé actif qu'il convient d'utiliser pour étudier la cinétique de la synthèse du matériel viral.

1 - Action du Fluoro-uracile

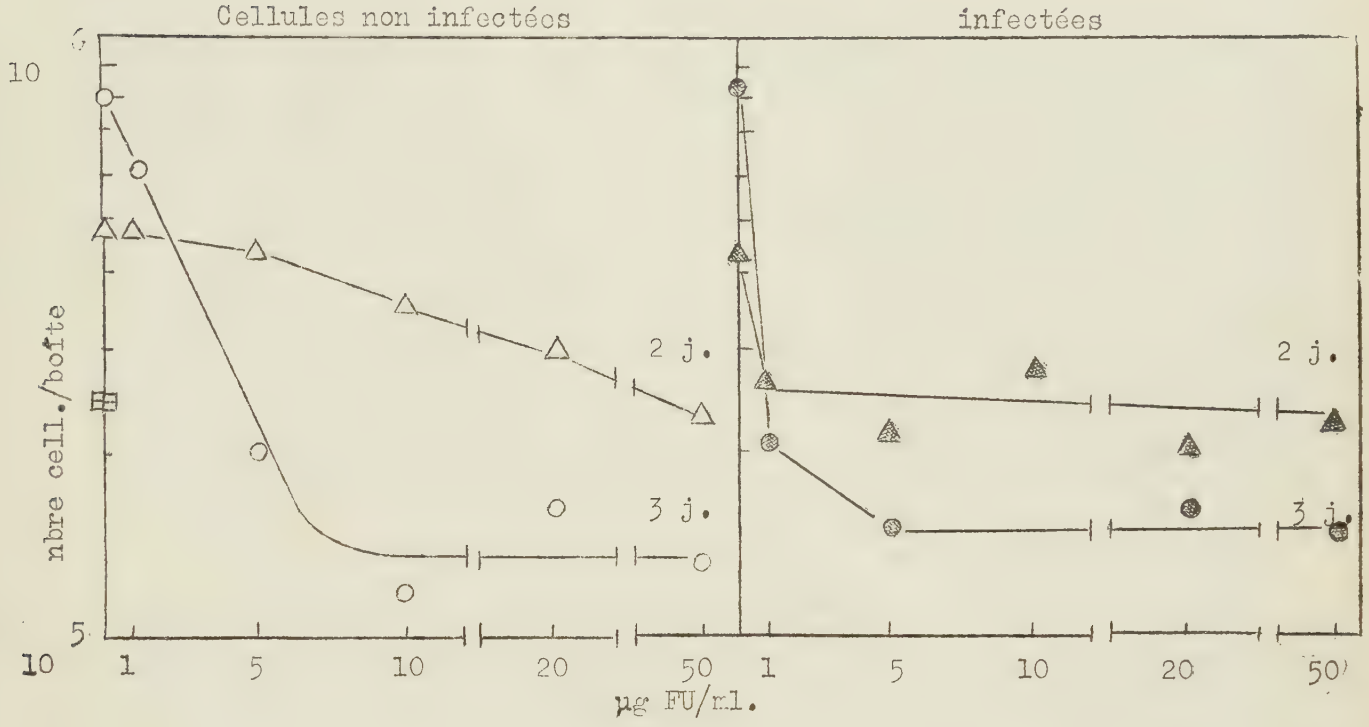
Les concentrations employées sont de 1, 5, 10, 20, 50 µg de FU par ml de milieu nutritif. La numération des cellules et le titrage du virus libéré dans le milieu sont effectués deux et trois jours après infection, c'est-à-dire trois et quatre jours après repiquage. On a étudié parallèlement l'action de ces différentes concentrations de FU sur la multiplication des cellules non infectées.

a) Multiplication des cellules non infectées et infectées

Comme on peut le voir dans la figure 14 et le tableau 11, les doses de 1 µg et 5 µg permettent aux cellules non infectées de se multiplier à la même vitesse que les cellules des cultures témoins jusqu'au 2e jour après l'addition de FU, alors qu'aux doses supérieures, la vitesse de

Figure 14

Action de doses croissantes de FU sur la multiplication des cellules infectées et non infectées.



Le fluoro-uracile a été ajouté dans le milieu nutritif 24 h. après repiquage dans les cultures non infectées; des séries de cultures parallèles ont été infectées 23 h. après le repiquage dans les conditions standard à une multiplicité de 0,5 UP/cell., et le fluoro-uracile n'a été ajouté dans le milieu qu'après 1 h. d'adsorption du virus.

L'inhibiteur est resté au contact des cellules jusqu'à la fin de l'expérience, après avoir été renouvelé tous les jours en même temps que les milieux nutritifs (6 ml. de milieu 721 par boîte).

On a compté le nombre total des cellules par culture 2 j. et 3 j. après addition de FU.

Chaque point des courbes représente la moyenne de deux boîtes.

Le rectangle situé à gauche sur l'axe des ordonnées représente le nombre des cellules fixées par boîte au moment de l'addition de FU dans les cultures infectées et non infectées.

Tableau 11

Action de doses croissantes de FU sur la multiplication des cellules infectées et non infectées (¥)

a) Cellules non infectées — Dose de FU (µg par ml de milieu)

Temps après addition de FU		Témoin sans FU	1	5	10	20	50
2 jours	log. du Nbre cell./boîte	5,68	5,68	5,65	5,56	5,48	5,37
	% du témoin	100	100	94	75	62	49
3 jours	log. du Nbre cell./boîte	5,90	5,78	5,30	5,06	5,22	5,12
	% du témoin	100	81	25	14	21	17

b) Cellules infectées (0,5 UP./cellule)

		Témoin sans FU	1	5	10	20	50
2 jours	log. du Nbre cell./boîte	5,64	5,43	5,34	5,46	5,35	5,36
	% du témoin	100	61	51	66	50	52
3 jours	log. du Nbre cell./boîte	5,91	5,32	5,19	-	5,23	5,17
	% du témoin	100	26	20	-	21	18

¥ FU est ajouté dès la fin de la période d'adsorption du virus, soit 24 heures après le repiquage, comme les cultures non infectées.

multiplication est d'autant plus ralentie que la concentration en FU est plus élevée. Par contre, la multiplication des cellules infectées est bloquée dès l'addtion de 1 µg/ml de FU, et le nombre des cellules à 2 jours est identique au nombre des cellules présentes au moment de l'addition de l'inhibiteur (figure 14).

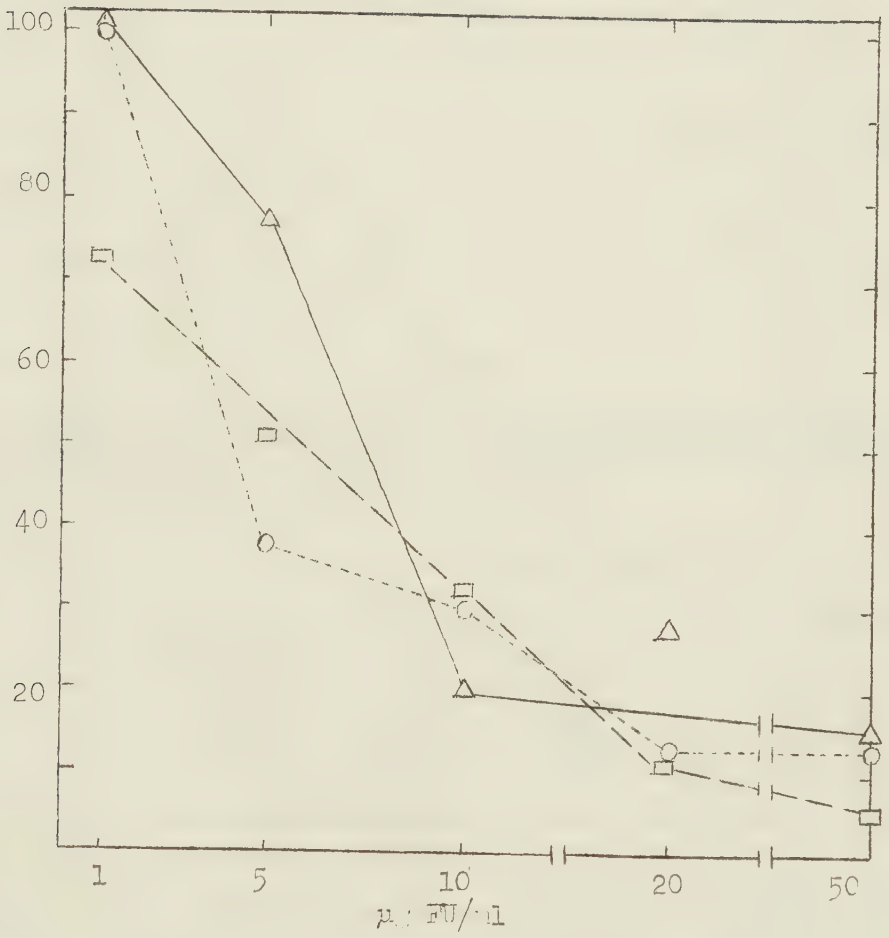
Dans les cultures infectées et non infectées, la prolongation à 3jours du temps de contact de FU avec les cellules peut provoquer une destruction cellulaire partielle, qui est maximum dès 10 µg pour les cellules témoins non infectées, et dès 5 µg pour les cellules infectées dans les expériences de la figure 14. Cependant, dans la majorité des expériences effectuées ultérieurement, l'addition de 20 µg/ml de FU au moment de l'infection, n'a pas entraîné de destruction cellulaire notable et les cellules sont restées stationnaires de 1 à 3 jours. Par contre, lorsqu'on ajoute 20 µg/ml de FU dans le milieu au moment du repiquage, l'action destructrice est assez prononcée après 3 jours de contact avec les cellules (tableau 17).

b) Inhibition de la production virale

La figure 15 montre que la production du virus 1 jour, 2 jours, 3 jours après infection et addition de l'inhibiteur, est d'autant plus faible que la concentration de FU est plus forte. On voit que la dose de 1 µg/ml de FU, qui est suffisante pour bloquer la multiplication des cellules, n'a aucune influence sur la production virale. Celle-ci est minimum à partir de 20 µg/ml. C'est pourquoi on a choisi cette dose pour effectuer toutes les expériences décrites dans les paragraphes suivants, au cours desquelles on fait agir une dose constante de FU sur les cellules à des moments divers du cycle de multiplication du virus.

Figure 15

Action de doses croissantes de FU ajouté au moment de l'infection, sur la production du virus 1 jour, 2 jours, et 3 jours après l'infection



Les cultures ont été infectées à une multiplicité de 0,2 UP/cell. dans les conditions standard 24 heures après repiquage. La concentration désirée de fluoro-uracile a été ajoutée dans le milieu nutritif (6 ml/boîte de milieu 721) 1 heure après la période d'adsorption du virus. On a renouvelé FU tous les jours en même temps que le milieu.

On a compté les cellules et titré le virus tous les jours jusqu'à 3 jours après l'infection.

Les résultats sont exprimés en pourcentages de la production virale dans les différents lots par rapport au témoin sans FU, après avoir rapporté tous les titres à un nombre de cellules égal à celui des cellules contenues dans les cultures témoins.

○------○ production virale à 1 jour
△——△ production virale à 2 jours
□- - -□ production virale à 3 jours

c) Action de FU sur le nombre des cellules productrices de virus

La réduction du titre du virus peut provenir soit d'une réduction de la production virale par centre infectieux, soit d'une diminution du nombre total des centres infectieux. C'est pour vérifier l'une ou l'autre hypothèse qu'on a titré les centres infectieux selon la méthode standard, 2 jours et 3 jours après infection. On voit, dans le tableau 12, que contrairement à ce qu'on a observé pour la production virale qui n'est pas ré-

Tableau 12

Action de doses croissantes de FU ajoutées au moment de l'infection sur le nombre total des cellules, des centres infectieux et sur la production virale à 2 jours et 3 jours

	Temps après infection et addition de FU	Témoin sans FU	Doses de FU (µg par ml)				
			1	5	10	20	50
log. Nbre de cell./boîte	2 jours +	5,64	5,43	5,34	5,48	5,33	5,38
	3 jours	5,91	5,32	5,19	-	5,23	5,18
Centres infectieux	2 jours	100	11	1,5	3,8	3	1,6
% du témoin	3 jours	100	71	7	6	7	1,5
Production virale	2 jours	100	100	78	20	28	15
% du témoin *	3 jours	100	72	51	32	12	5

* les pourcentages de la production virale ont été calculés après avoir ramené tous les titres des différents lots à un nombre égal de cellules.

\+ Il s'agit de 2 expériences différentes, dont l'une a été arrêtée à 2 jours, et l'autre à 3 jours.

duite par addition de 1 µg/ml de FU, le nombre des centres infectieux est à cette concentration nettement inférieur à celui des cultures témoins sans FU ; il atteint un minimum dès 5 µg/ml. Ces résultats suggèrent que les cellules productrices de virus, dont les mitoses sont bloquées dès 1 µg/ml de FU, sont dans un état peu propice pour être détectées par la méthode de titrage utilisée, c'est-à-dire par la formation de pocks sur la chorio-allantoïde de l'oeuf. Il est possible aussi que le fait de décoller les cellules du verre avec la trypsine et de les laver ensuite plusieurs fois les rende fragiles, provoquant leur destruction partielle après l'inoculation. Pour cette raison, nous n'avons plus effectué, dans la majorité des expériences ultérieures, que le titrage du virus libéré dans les milieux de cultures.

II - ACTION DE LA FLUORO-DESOXYURIDINE

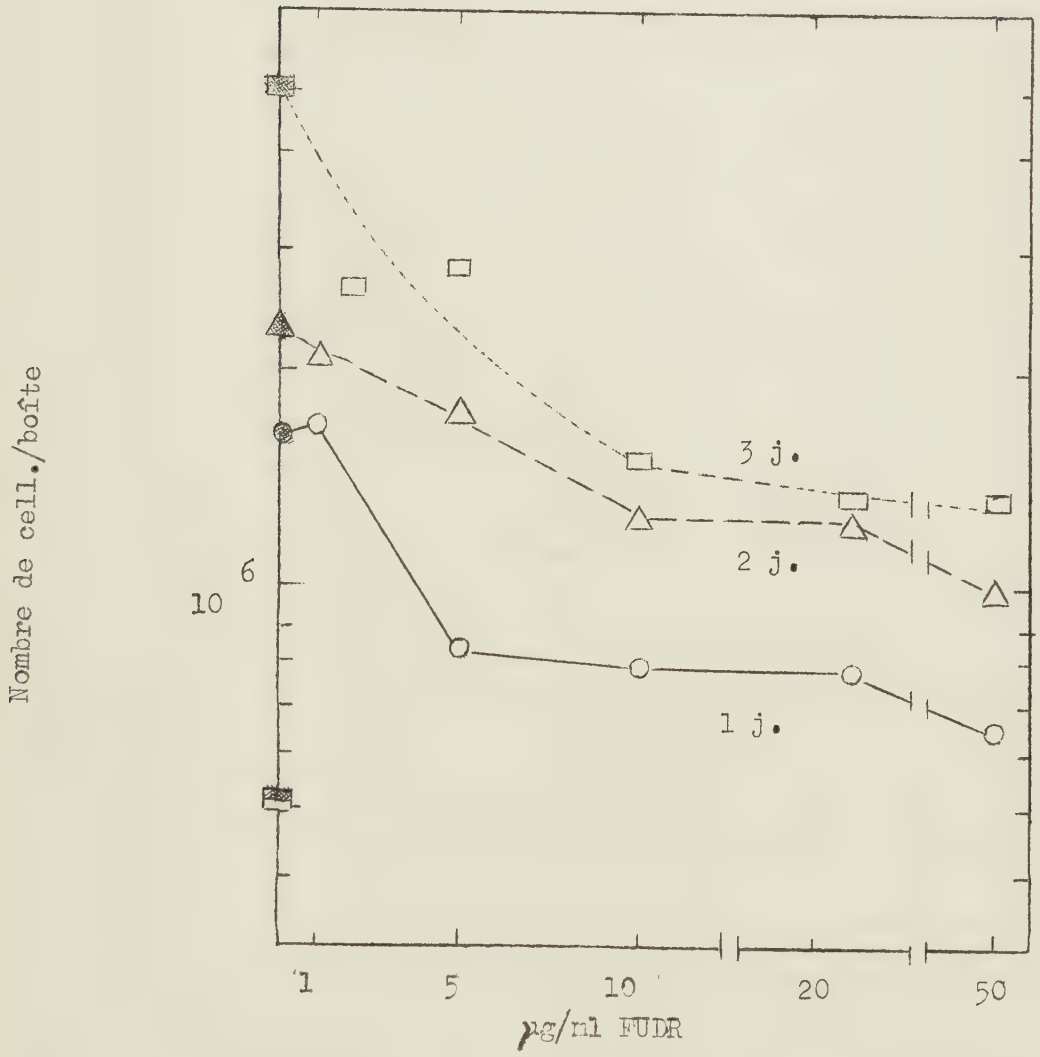
Comme pour FU, des concentrations de FUDR de 1, 5, 10, 20 et 50 µg/ml ont été ajoutées dans les milieux de cultures 24 heures après le repiquage pour les cellules non infectées, et au moment de l'infection pour les cellules infectées. On a compté les cellules et titré le virus 1 jour, 2 jours, et 3 jours après l'addition de l'inhibiteur.

1) Action sur la multiplication des cellules infectées et non infectées

Le tableau 13 et la figure 16 montrent que la multiplication des cellules non infectées est réduite aux doses comprises entre 5 et 20 µg, alors qu'elle est bloquée dès le premier jour à la dose de 50 µg. Par contre, comme dans le cas de FU, les cellules infectées semblent plus sensibles

Figure 16

Action de doses croissantes de FUDR sur la multiplication des cellules non infectées



La concentration désirée de FUDR a été ajoutée dans le milieu nutritif 24 heures après repiquage, et laissée au contact des cellules jusqu'à la fin de l'expérience.

On a compté les cellules 1 jour, 2 jours et 3 jours après addition de l'inhibiteur; chaque point des courbes représente la moyenne de 2 boîtes.

Les points qui figurent sur l'axe des ordonnées représentent le nombre des cellules par boîte dans les cultures témoins dépourvues de FUDR.

Le rectangle ▭ représente le nombre des cellules fixées au moment de l'addition de l'inhibiteur.

TABLEAU 13

Action de doses croissantes de FUDR ajoutées 1 jour après repiquage, sur la multiplication des cellules infectées et non infectées (log. du nombre des cellules par boîte et pourcentages par rapport aux cultures témoins).

Cellules (1)	Age des cultures à partir de l'addition de FUDR (2)	Témoin sans FUDR		concentration de FUDR (µg par ml)									
				1		5		10		20		50	
		log.nbre de cell./ boîte	% témoin	log.nbre de cell/ boîte	% témoin	log.nbre de cell/ boîte	% témoin	log.nbre de cell/ boîte	% témoin	log.nbre de cell/ boîte	% témoin	log.nbre de cell/ boîte	% témoin
non infectées	1 j.	6,21	100	6,23	100	5,93	52	5,90	47	5,88	47	5,78	37
	2 j.	6,36	100	6,33	100	6,25	77	6,10	55	6,11	55	5,99	42
	3 j.	6,68	100	6,42	55	6,44	55	6,17	31	6,10	26	6,12	27
infectées	1 j.	5,98	100	-	-	5,75	60	-	-	5,60	41	5,60	41
	2 j.	5,95	100	-	-	5,70	56	5,60	40	5,60	40	-	-
	3 j.	6,10	100	-	-	5,80	50	-	-	5,55	28	5,50	25

(1) Les séries infectées et non infectées ont été faites à partir de cultures secondaires différentes, ce qui explique que le nombre des cellules et leur vitesse de croissance de 1 à 3 jours ne sont pas les mêmes dans les cultures témoins infectées et non infectées dépourvues de FUDR.

(2) Le moment de l'addition de FUDR, qui est resté au contact des cellules jusqu'à la fin de l'expérience, correspond à 24 heures après le repiquage dans les cultures non infectées, et à 23 h. + 1 h., d'adsorption du virus dans les cultures infectées. Dans les deux séries de cultures, le nombre des cellules fixées était de $10^{5,70}$ par boîte au moment de l'addition de l'inhibiteur.

à l'action de FUDR que les cellules non infectées, car leurs mitoses sont bloquées à la dose de 5 µg/ml dès leur contact avec l'inhibiteur; leur nombre reste en effet égal au nombre des cellules présentes au moment où on a ajouté FUDR. Ce dernier n'a pas d'action toxique notable, étant donné que le nombre des cellules infectées reste pratiquement stationnaire de 1 à 3 jours après son addition dans le milieu de culture.

2) Action sur la production du virus

Aucune des doses utilisées n'inhibe la multiplication du virus titré 1 jour, 2 jours, et 3 jours après l'infection.

B. INHIBITION DE LA PRODUCTION VIRALE PAR UNE DOSE DE 20 µg/ml DE FU AJOUTEE A DIVERS MOMENTS DU CYCLE DE MULTIPLICATION DU VIRUS

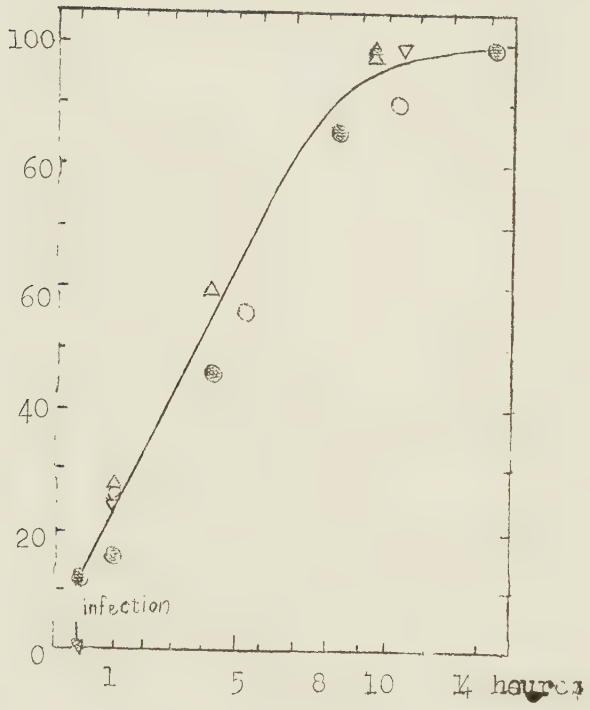
L'addition de l'inhibiteur à divers moments du cycle de multiplication du virus nous permet de préciser la cinétique de la synthèse des précurseurs viraux. En effet, dans ces conditions, les particules infectieuses présentes dans le milieu au moment du prélèvement sont celles qui ont été formées à partir du matériel viral synthétisé avant l'addition de l'inhibiteur.

1) Action de FU ajouté durant la période de l'éclipse sur la production virale 1 jour, 2 jours et 3 jours après l'infection

20 µg/ml c'est-à-dire 120 µg de FU par boîte, sont ajoutés dans les milieux de cultures 1 h., 4 h., 5 h., 8 h., 9.h., 10 h., 14 h., après le

Figure 17

Action de 20 µg/ml de FU ajouté à divers moments après l'infection sur la production du virus à 1 jour,
(pourcentages du témoin)



moment de l'addition de FU

Le fluoro-uracile a été ajouté durant la période d'éclipse, c'est à dire, 1 h., 5 h., 8 h., 9 h. 10 h., et 14 h., après le début de l'infection.

Le premier point ● correspond à la production du virus dans les cultures où FU a été ajouté en même temps que l'inoculum viral, c'est-à-dire dès le début de l'infection.

Les résultats de 4 expériences différentes sont représentés dans cette figure, chaque point étant la moyenne de la production virale de 2 cultures.

début de l'infection. On compte les cellules et on titre le virus 1 jour, 2 jours et 3 jours après l'infection.

Les résultats de 4 expériences différentes, dans lesquelles le virus a été titré un jour après l'infection, sont groupés dans la figure 17. On voit que plus FU est ajouté tardivement par rapport à l'infection au cours de la période d'éclipse, et moins la production virale de 1 jour est affectée par l'inhibiteur ; la production du virus est minimum quand FU est ajouté à partir de 1 heure après infection; elle est déjà égale à 50% de celle du témoin sans FU quand l'inhibiteur est ajouté à partir de 4 heures tandis qu'elle est identique à celle du témoin dans les lots où FU a été ajouté 9 heures après l'infection. Ces résultats suggèrent que tout le matériel précurseur du virus libéré à 1 jour a été synthétisé durant les 9 premières heures qui ont suivi l'infection.

En ce qui concerne la production virale à 2 jours, la figure 18 montre qu'elle est minimum quand FU est ajouté 1 heure et 4 heures après l'infection ; l'amorce d'une augmentation de la production dans les lots où FU a été ajouté de 4 heures à 9 heures après l'infection suggère qu'une partie des précurseurs du virus libéré à 2 jours étaient déjà synthétisés à la fin de la période d'éclipse. Ceci sera d'ailleurs confirmé ultérieurement.

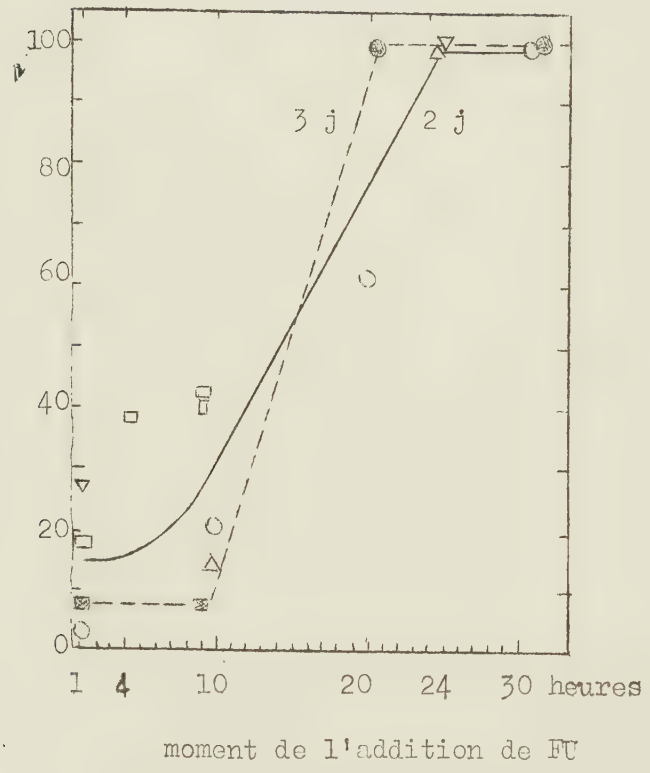
Quant au virus titré 3 jours après l'infection, sa production est minimum quel que soit le moment de l'addition de FU durant la période d'éclipse, ce qui tend à démontrer que les précurseurs des particules infectieuses libérées à 3 jours ne sont synthétisés qu'après la période d'éclipse.

Les centres infectieux

On les a titrés dans une série d'expériences effectuées dans

Figure 18

Action de 20 µg/ml de FU ajouté à divers moments après l'infection, sur la production du virus à 2 jours et 3 jours (pourcentages du témoin)

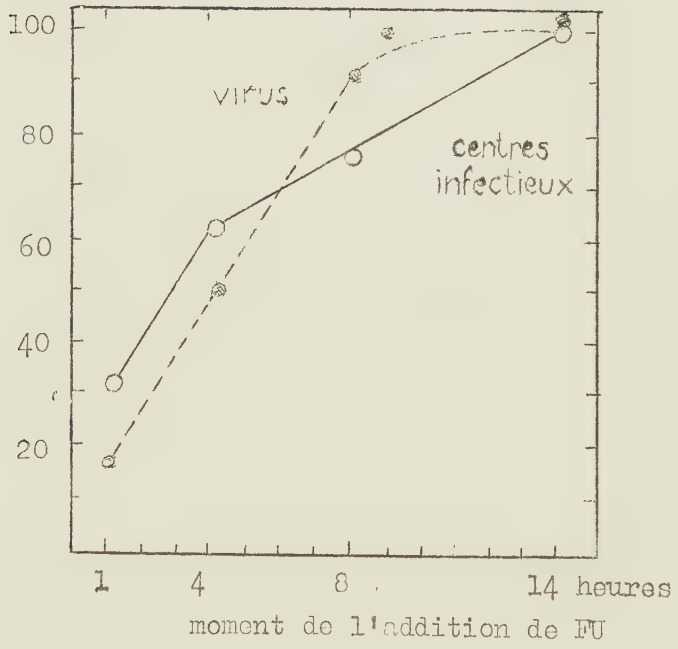


Le fluoro-uracile a été ajouté 1 heure, 4 heures, 10 heures, 20 heures, 24 heures, et 30 heures après le début de l'infection. Chaque point représente également la moyenne de 2 cultures.

Dans les deux figures 17 et 18, les résultats sont exprimés en pourcentages de la production par rapport au témoin infecté sans FU, après avoir ramené tous les titres à un nombre de cellule égal à celui des témoins.

Figure 19

Comparaison de l'action de 20 µg/ml de FU ajouté à divers moments de la période d'éclipse, sur la production virale et le nombre des centres infectieux à 1 jour (pourcentage du témoin)



On a titré le virus libre contenu dans le milieu, et les centres infectieux 1 jour après l'infection.

Le fluoro-uracile a été ajouté 1 h., 4 h., 8 h., 9 h., et 14 h., après le début de la période d'adsorption du virus.

La production virale et le nombre des centres infectieux sont exprimés en pourcentages par rapport au témoin sans FU, après avoir ramené les titres des différents lots, à un nombre de cellules égal à celui des cultures témoins. Les centres infectieux ont été titrés dans les conditions standard après avoir éliminé la majorité du virus adsorbé sur les membranes cellulaires par lavage durant 4 heures avant l'inoculation.

les mêmes conditions que celles décrites précédemment.

On voit dans la figure 19 que la réduction de la production globale par culture observée quand on ajoute FU à divers moments de la période d'éclipse est parallèle à la réduction du nombre des centres infectieux titrés un jour après l'infection. Ceci peut s'interpréter de deux manières; il est possible que seule une fraction de la population de cellules infectées incorpore le fluoro-uracile et ne produit plus de particules infectieuses ; cependant, cette hypothèse paraît peu probable étant donné que l'arrêt de la multiplication globale des cellules infectées cultivées en présence de FU suggère une incorporation de l'inhibiteur dans la majorité, sinon dans toutes les cellules. C'est pourquoi nous pensons que la réduction du nombre des centres infectieux doit plutôt correspondre à une réduction de la production moyenne par cellule ; cette réduction diminuerait alors les chances qu'aurait chaque cellule infectée de libérer suffisamment de particules infectieuses pour être détectée comme centre infectieux dans les limites de temps de la méthode de titrage. Les résultats qui figurent dans le tableau 14, confirment ce que l'on a dit dans un des paragraphes précédents, c'est-à-dire que la prolongation du temps de contact de FU jusqu'à 2 jours rend les cellules trop fragiles pour que les titrages des C.I. aient encore un sens.

2) Action de FU ajouté au delà de la période d'éclipse sur la production du virus pendant plusieurs jours après l'infection

Dans une première série d'expériences, on a étudié l'action inhibitrice de FU ajouté 20 h., 24 h., et 30 h., après l'infection sur le virus produit à 2 jours et 3 jours ; on voit d'après la figure 18 que la

Tableau 14

Action d'une dose déterminée de FU (20 µg/ml) sur le nombre total des cellules, des centres infectieux, et sur la production virale à 1 jour et 2 jours, en fonction du moment de son addition durant la période d'éclipse (multiplicité d'infection = 0,1 UP/cellule)

	Age des cultures après infection	Témoin sans FU	Moment de l'addition du FU après le début de l'infection			
			1 h.	4 h.	8 h.	14 h.
log. du Nbre des cell./boite	1 j.	5,51	5,33	5,43	5,40	5,47
	2 j.	5,78	5,49	5,63	5,58	-
centres infectieux	1 j.	100	30	62	75	100
% du témoin	2 j.	100	6	7	4	-
Production virale	1 j.	100	17	48	91	100
% du témoin ⁂	2 j.	100	39	42	18	-

⁂ Comme dans le tableau 12, les pourcentages ont été calculés après avoir rapporté les titres, dans chaque lot, à un nombre de cellules égal à celui des cellules contenues dans les cultures témoins.

---

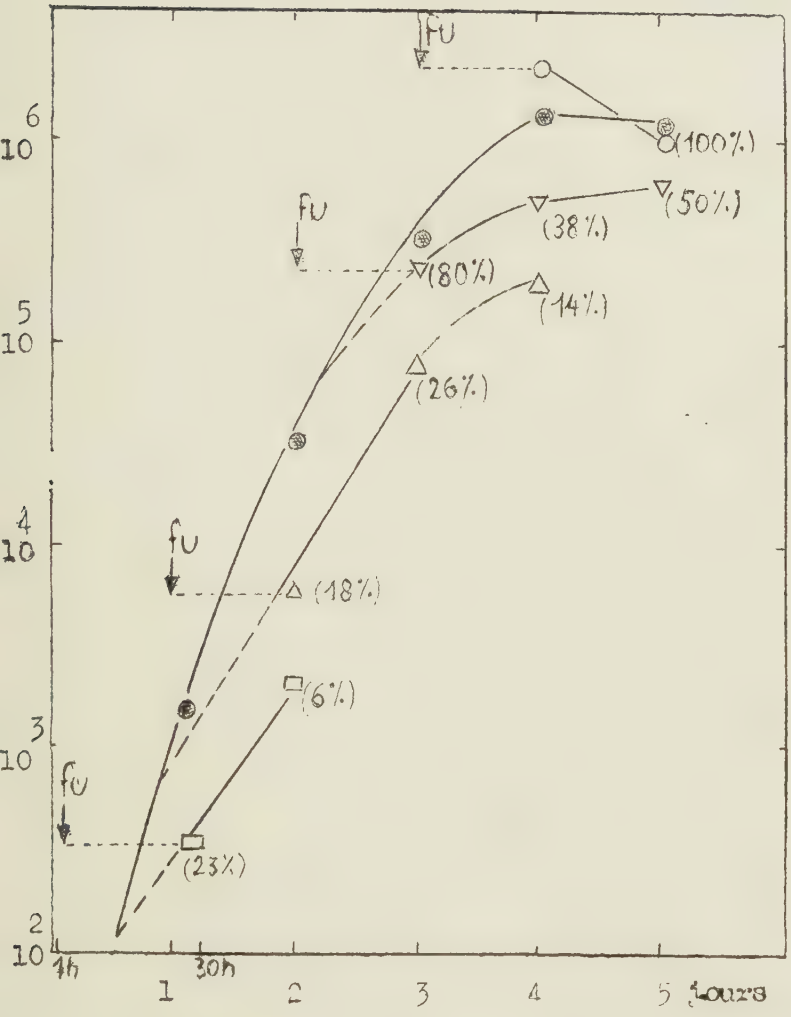
production virale aussi bien 2 jours que 3 jours après l'infection est égale à celle du témoin quand FU est ajouté au delà de 24 heures. Ceci suggère que tout le matériel viral destiné à former les particules infectieuses produites à 2 jours et 3 jours a été synthétisé pendant le premier jour qui a suivi l'infection.

Dans une seconde série d'expériences, on a étudié systématiquement l'action inhibitrice de FU ajouté dans différents lots de cultures 1 jour, 2 jours et 3 jours après l'infection le virus étant titré pour chaque lot, 1 jour, 2 jours et 3 jours après l'addition de l'inhibiteur. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 20 et 21. En ce qui concerne le virus produit à 1 jour et 2 jours quand FU a été ajouté 1 heure après l'infection, on voit que les résultats sont en accord avec ce qui a été vu précédemment; de même, FU ajouté à 1 jour réduit le titre du virus libéré 2 jours, 3 jours et 4 jours après l'infection. Pour ces lots, la production minimum est en moyenne égale à 20% de celle du témoin dépourvu de FU. D'autre part, on constate que FU ajouté 2 jours après l'infection n'inhibe pas la production virale à 3 jours d'une façon significative, ce qui suggère que les précurseurs des particules titrées à 3 jours ont du être synthétisés avant 2 jours, confirmant ainsi ce qui a été dit ci-dessus. L'addition de FU 2 jours après infection inhibe par contre la production du virus à 4 jours et 5 jours; cependant le fait que le titre du virus est assez élevé, 40% et 50% de celui des cultures témoins, tend à démontrer qu'une partie des précurseurs a pu être aussi synthétisée avant 2 jours.

On voit que FU ajouté 3 jours et 4 jours après l'infection n'a plus aucune action inhibitrice sur la production du virus à 4, 5 et 6 jours. Les

Figure 20

Action de FU (20 µg/ml) ajouté 1 h., 1 j, 2 j, et 3 j après l'infection sur la production journalière du virus pendant 5 jours



On a titré le virus et compté les cellules tous les jours pendant 5 jours. Les milieux ont été renouvelés tous les jours.

Tous les titres sont exprimés en log. du nombre d'UP par boîte.

Les titres des différents lots expérimentaux ont été calculés pour un nombre de cellules égal à celui des cultures témoins dépourvues de FU.

La courbe en traits pleins ●—● représente la croissance du virus dans les cultures témoins.

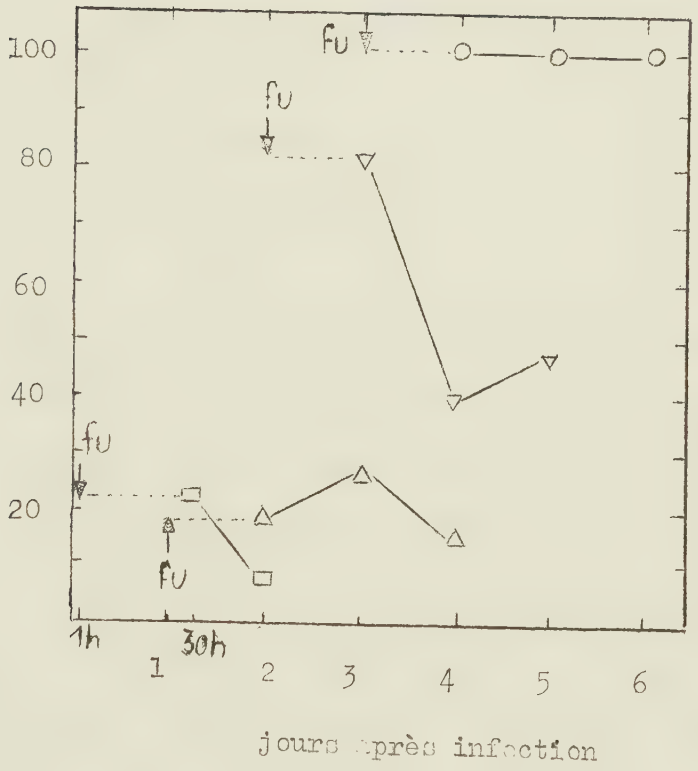
4 séries de lots différents ont été effectuées parallèlement :

- dans la Ière (□), FU (flèche) a été ajouté 1 h. après infection, et le virus titré à 1 j et 2 j.
- dans la 2ème (△), FU (flèche) a été ajouté 1 j après infection, et le virus titré a 2j, 3j et 4 j; c'est-à-dire 1 j, 2 j, et 3 j. après l'addition de l'inhibiteur ;
- dans la 3ème (▽), FU (flèche) a été ajouté 2 j. après infection, et le virus titré à 3 j, 4 j et 5 j, c'est-à-dire 1 j, 2 j, et 3 j, après l'addition de l'inhibiteur.
- dans la dernière série (○), FU (flèche) a été ajouté 3 j après infection, et le virus titré à 4 j et 5 j, c'est-à-dire 1 j et 2 j après l'addition de l'inhibiteur.

Les nombres entre parenthèses, à côté de chaque point de ces courbes, indiquent les pourcentages que représentent les titres calculés par rapport au titre du témoin. Ces pourcentages ont été reportés dans la figure 21.

Figure 21

Pourcentages de la production virale par rapport au témoin, dans différents lots de cultures où FU a été ajouté à divers moments du cycle de multiplication du virus



Ce sont les expériences de la figure 20.

Le fluoro-uracile (20 µg/ml) a été ajouté, suivant les cultures, 1 h., 2 j., ou 3 j. après l'infection. Le virus a été titré tous les jours durant les 2 ou 3 jours qui ont suivi l'addition de l'inhibiteur.

Les flèches représentent le moment de l'addition de FU après l'infection.

Comme précédemment, les pourcentages ont été calculés après avoir ramené les titres des différents lots à un nombre de cellules identique à celui des cultures témoins.

précurseurs viraux paraissent donc avoir été synthétisés avant le 3e jour qui a suivi l'infection. L'examen de la figure 20 montre que les titres du virus, dans les lots où FU a été ajouté 1 h., 1 jour, ou 2 jours après infection, augmentent parallèlement au titre du témoin, l'inhibition de la production restant néanmoins à un taux pratiquement constant du 1er au 3e jour qui suit l'addition de l'inhibiteur. Ce fait démontre que même en présence de FUpendant 2 et 3 jours, les cellules qui avaient déjà synthétisé le matériel viral au moment de l'addition de l'inhibiteur restent capables de continuer à produire le virus normalement, comme les cellules témoins.

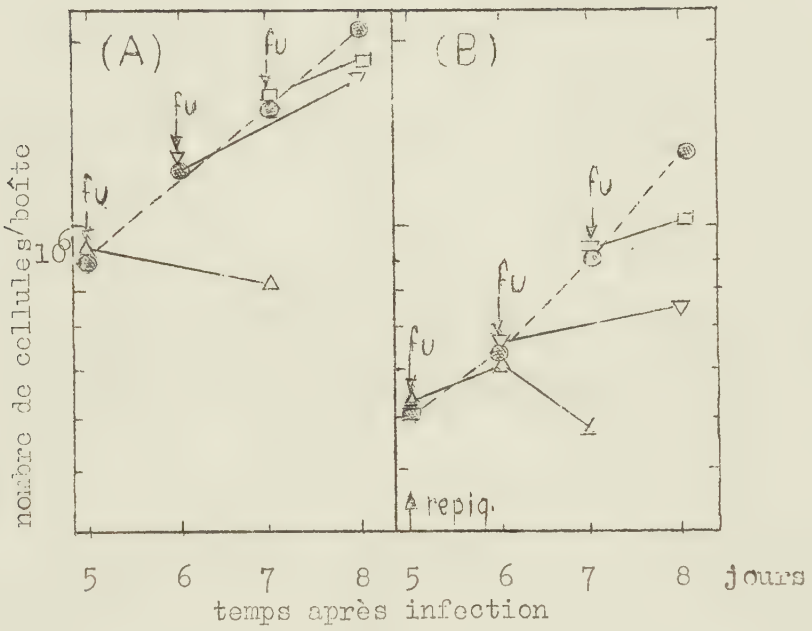
Afin de vérifier si le fait de ne pouvoir agir sur la production virale en ajoutant FU au delà de 3 jours ne proviendrait pas de la non incorporation de l'inhibiteur par les cellules de poulet converties en cellules de Rous, nous avons réalisé l'expérience suivante :

Des cellules infectées sont cultivées dans les conditions standard pendant 5 jours après l'infection. A 5 jours, une partie des cultures est conservée sans repiquage jusqu'à 8 jours (A), tandis que l'autre partie est repiquée (B) afin de permettre aux cellules de se multiplier. On ajoute FU dans des lots différents à partir de 5 jours, 6 jours, et 7 jours ; on compte les cellules et on titre le virus respectivement à 6 jours, 7 jours, et 8 jours.

La figure 22 (A) montre que des cellules infectées depuis 5 jours non repiquées, peuvent encore incorporer FU puisque mises en présence de l'inhibiteur, leur multiplication est réduite par rapport à celle des cellules sans FU ; à partir de 6 jours, il semble que FU n'ait plus qu'une

Figure 22

Action de FU (20 µg/ml) sur la multiplication des cellules infectées repiquées ou non repiquées 5 jours après l'infection.



Une série de cultures a été infectée à une multiplicité suffisante pour infecter toutes les cellules. 5 jours après l'infection, on a constitué 2 lots - le lot (A) a été conservé sans repiquage jusqu'à 8 jours, tandis que le lot (B) a été repiqué à 5 jours et conservé également jusqu'à 8 jours.

En dehors des cultures témoins infectées dépourvues de FU, représentées par les droites en trait discontinu, 3 séries expérimentales ont été constituées :

- dans la 1ère (Δ) FU a été ajouté à 5 j. c'est-à-dire, dans le milieu de repiquage pour les cellules repiquées ; dans la 2ème (▽) FU a été ajouté à 6 j., et dans la 3ème il a été ajouté à 7 j. (□).

On a compté les cellules tous les jours dans les cultures témoins dépourvues de FU, et 1 j. 2 j., ou 3 j., après l'addition du fluoro-uracile dans les autres cultures.

Les résultats sont exprimés en log. du nombre total de cellules par boîte (moyenne de 2 boîtes).

faible action sur la multiplication des cellules. Au contraire, la figure 22 (B) montre que le repiquage rend les cellules de Rous plus sensibles à FU, étant donné que leur multiplication est bloquée dès le contact avec l'inhibiteur, que celui-ci ait été ajouté dans le milieu à 5, 6, ou 7 jours. On peut voir cependant dans le tableau 15 que tous les titres sont identiques à ceux des cultures témoins sans FU, aussi bien dans la série (A) que dans la série B ; ceci confirme que le fluoro-uracile n'agit pas sur la production virale de cellules de Rous âgée de plus de 3 jours.

C. ACTION DE DUREES DE CONTACT LIMITEES DE FU (20 µg/ml) SUR LA MULTIPLICATION DES CELLULES DU VIRUS

On a vu que le fluoro-uracile a un effet toxique assez prononcé sur les cellules d'autant plus marqué qu'il reste plus longtemps en leur présence. Ceci conduit à se poser la question suivante : FU ajouté de 1 à 3 jours après l'infection réduit-il la production virale d'une façon spécifique, en inhibant directement la synthèse du matériel viral, ou bien la réduction de la production résulte-t-elle d'une intoxication générale de la cellule infectée qui la rend peu apte à synthétiser le virus ? C'est pour répondre à cette question que nous avons entrepris une série d'expériences au cours desquelles les durées de contact de FU avec les cellules sont limitées à des moment précis de la multiplication du virus, et ont une action toxique minimum vis à vis des cellules.

Tableau 15

Action de FU sur la production virale dans des cultures infectées non repiquées et repiquées 5 jours après infection (Titres en log. du nbre d'UP/par boite *)

a) Cultures non repiquées

Moment de l'addition de FU après infection		Age des cultures après infection		
	5 j.	6 j.	7 j.	8 j.
Témoin sans FU	6	5,65	5,80	5,80
5 j.		5,75	5,80	5,95
6 j.			6,25	5,60
7 j.				5,80

b) Cultures repiquées à 5 jours

Moment de l'addition de FU	5 j.	6 j.	7 j.	8 j.
Témoin sans FU 5 j.	5,15 +	5,25	5,50	5,55
5 j. (repiquage)		5,30	5,30	5,45
6 j.			5,45	5,45
7 j.				5,70

* Tous les titres ont été rapportés à un nombre de cellules égal au nombre des cellules contenues dans les cultures témoins sans FU.

+ Ce nombre représente le log^{e} du titre du virus correspondant au nombre des cellules (5.10^5) ensemencées par boîte au moment du repiquage.

1 - Durées de contact limitées de FU pendant la période d'éclipse du virus

20 µg/ml de FU ont été ajoutés, à partir de la fin de la période d'adsorption du virus, pendant 1 h., 3 h., 5 h., 8 h., ; les cellules infectées soumises à l'action de FU, ont été ensuite lavées 2 fois et remises en présence du milieu standard 721.

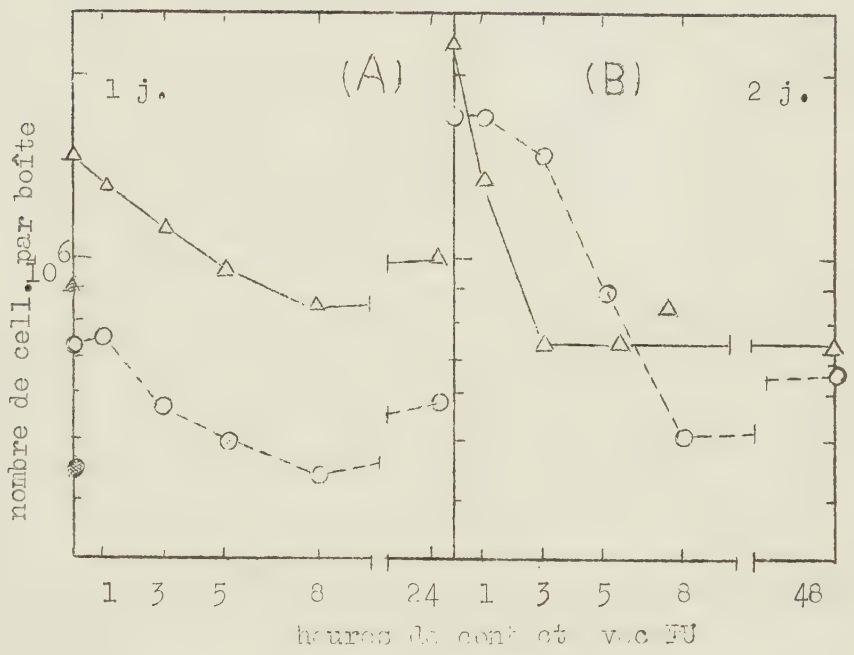
La numération des cellules et les titrages du virus ont été effectués 1 jour et 2 jours après l'infection.

a) Action sur la multiplication des cellules

Deux expériences typiques (n° 21 et n° 25) sont représentées dans la figure 23. On voit (fig° 23 A) que pour des durées de contact de FU de 1 h., 3 h., 5 h., et 8 h., le nombre des cellules comptées 1 jour après l'infection est d'autant plus faible que le temps de contact avec FU a été plus long. A partir de 8 heures de contact, l'action de l'inhibiteur sur les mitoses est maximum et identique à celle que l'on observe en le laissant dans le milieu jusqu'à la fin de l'expérience; dans les lots où FU est resté 8 heures, le nombre des cellules à 1 jour est égal au nombre des cellules présentes au moment de l'addition de FU. La figure 23 B montre que dans l'expérience n° 25, une fraction de la population cellulaire a continué à se multiplier jusqu'à 2 jours pour des temps de contact de 3 heures et 5 heures, tandis que les cellules restées 8 heures et 48 heures en présence de FU sont demeurées stationnaires. Dans l'expérience n° 21 par contre, la multiplication partielle qui s'était produite pendant le premier jour pour les lots qui n'étaient restés que 1 heure en présence de FU est complètement arrêtée à 2 jours et les cultures sont stationnaires. Il semble, de plus y avoir une destruction cellulaire à partir de 3 heures de contact de l'inhibiteur avec les cellules (tableau 16). Dans l'ensemble tout se passe comme si les

Figure 23

Action de durées de contact limitées de FU (20 µg/ml) sur la multiplication des cellules infectées



Les courbes en traits pleins représentent l'expérience n° 21, celles en traits discontinus représentent l'expérience n° 26. Dans les 2 expériences, 20 µg/ml de FU ont été ajoutés à partir de la fin de la période d'adsorption du virus pendant 1 h., 3 h., 5 h., 8 h., les cellules ont été ensuite lavées 2 fois avec M "199" et remises en présence du milieu standard. Des cultures témoins sans FU ont été faites parallèlement dans le milieu 721 et les points correspondants sont sur l'axe des ordonnées (Δ) pour l'expérience n° 21, et (○) pour l'expérience n° 25, dans les parties A et B de la figure.

Dans un autre lot de cultures, FU a été laissé au contact des cellules jusqu'à la fin de l'expérience; ce sont les points des courbes A et B qui figurent à 24 h. et 48 h.

Les signes pleins (▲) et (●) sur l'axe des ordonnées de 23 (A) représentent le nombre des cellules présentes dans les cultures n° 21 et n° 25 respectivement, au moment de l'addition de l'inhibiteur.

On a compté les cellules dans chaque lot 1 j. et 2 jours après l'infection. Les résultats sont exprimés en log• du nombre total de cellules par boîte.

Tableau 16

Action de FU sur la croissance cellulaire et la production virale à 1 jour et 2 jours, en fonction de sa durée de contact (exp. n° 21) avec les cellules

Temps en jours après infection	Moment de l'addition de FU après l'infection					
	1h à 2h	1h. à 4h.	1h. à 6 h.	1h. à 9h.	de 1h. à la fin de l'expérience	
	Durée du contact de FU avec les cellules infectées					
	1 h.	3 h.	5 h.	8 h.	24 h.	48 h.
1 jour	70% ⁂ (6,12)+	45 % (6,05)	25% (6)	30% (5,9)	26% (6)	
2 jours	100% (6,13)	100 % (5,95)	100% (5,85)	47% (5,90)	-	54% (5,84)

⁂ Pourcentages de la production virale par rapport au témoin sans FU, calculés après avoir rapporté tous les titres à un nombre de cellules égal à celui des cultures témoins sans FU.

+ Log° du nombre total des cellules par boîte (moyenne de 2 boîtes)

cellules des cultures n° 21 étaient plus fragiles ou avaient incorporé FU plus rapidement que les cellules des cultures n° 25. Une autre hypothèse plus vraisemblable, compte tenu des résultats obtenus ultérieurement au cours du dosage des acides nucléiques et des protéines (chapitre V), est que dans l'expérience n° 25, les cellules ont accumulé plus de métabolites que les cellules de l'expérience n° 21 au cours des 24 heures qui ont suivi

le repiquage c'est-à-dire avant l'addition de l'inhibiteur. Dans ces conditions, une fraction de la population cellulaire a pû continuer à se multiplier jusqu'au 2ème jour en utilisant ses réserves métaboliques.

b) Action sur la production virale

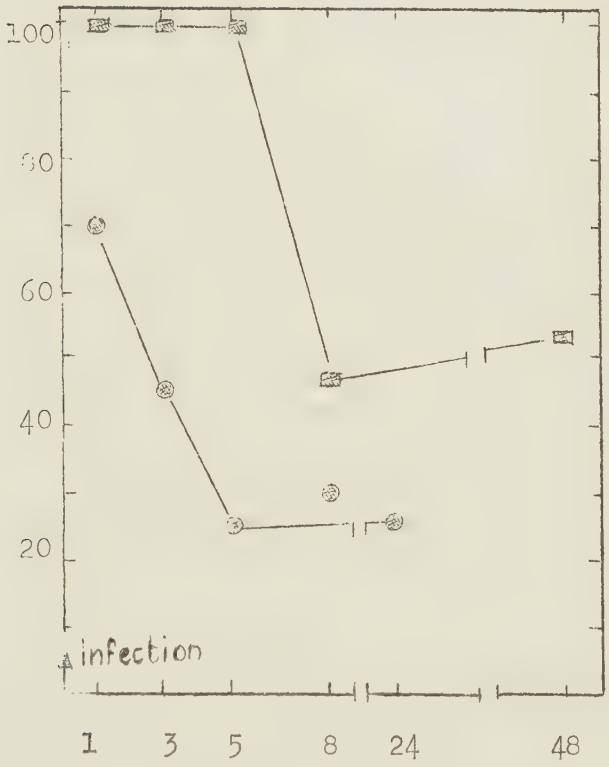
Comme le montrent la figure 24 et le tableau 16, 5 heures de contact du fluoro-uracile durant la première moitié de la période d'éclipse, provoquent la réduction maximum de la production virale 1 jour après l'infection, alors qu'il n'y a aucune réduction de la production à 2 jours. D'autre part, un contact de 8 heures de FU avec les cellules après l'infection provoque la réduction maximum du virus produit à 2 jours (Exp. n° 21). On voit nettement, d'après la figure 24 que les précurseurs des particules infectieuses produites à 1 jour ont bien été synthétisés en majeure partie pendant les 5 premières heures qui ont suivi l'infection, tandis que 50% des précurseurs des particules produites à 2 jours ont été synthétisés entre 5 heures et 8 heures après l'infection.

D'autre part, on peut voir plus loin, dans le tableau 19 qu'une durée de contact du FU de 16 heures ne réduit pas la production du virus libéré à 3 jours ; ceci démontre que les précurseurs de ce virus ont été synthétisés après 16 heures, et si l'on se reporte à la figure 18, on peut dire qu'ils ont été synthétisés entre 16 et 48 heures après l'infection.

Une remarque doit être faite à propos de la valeur minimum du pourcentage de la production virale par rapport au témoin, observée un jour après l'infection, quand on laisse l'inhibiteur au contact des cellules infectées dans des conditions optimum, c'est à dire pendant au moins 5 heures.

Figure 24

Action de durées de contact limitées de FU (20 µg/ml) pendant la période d'éclipse sur la multiplication du virus 1 jour et 2 jours après infection



Il s'agit de la production du virus dans l'expérience n° 21 pour laquelle les nombres des cellules dans les différents lots sont représentés dans la figure 23 (courbes en traits pleins). Le processus expérimental est décrit dans la figure 23.

Les résultats de la production virale 1 j. et 2 jours après infection sont exprimés en pourcentages par rapport au témoin sans FU, après avoir corrigé les titres pour un nombre de cellules égal à celui des cultures témoins.

Dans l'expérience du tableau 16, ce minimum est de 25%, tandis que dans d'aut d'autres expériences (tableau 17 (3)) il a varié de 10 à 40%. Ceci signifie que 10 à 40% des particules infectieuses libérées à 1 jour ont été formées à partir de précurseurs viraux normaux synthétisés par la cellule. Pour expliquer cette particularité, l'hypothèse la plus vraisemblable est que ces précurseurs ont été formés à partir des métabolites présents dans la cellule au moment de l'infection, avant l'addition de l'inhibiteur. Ceci pourrait expliquer pourquoi, dans certaines expériences, la réduction de la production virale par FU ajouté au début de la période d'éclipse, est quelquefois moins accentuée 1 jour que 2 jours après l'infection. Ainsi les pourcentages de la production à 1 jour et 2 jours étaient respectivement de 54% et 28% dans l'expérience n° 22, 37% et 30% dans l'expérience n° 23, 50% et 17% dans l'expérience n° 25. Pour confirmer cette hypothèse, on a réalisé la série d'expériences décrites dans le paragraphe suivant.

2 - Durée de contact limitée des cellules avec FU avant l'infection

Dans ces expériences, FU a été ajouté dans le milieu au moment du repiquage, donc 24 heures avant l'infection ; une partie a été remise en présence du milieu normal 721 dès l'infection, tandis que l'autre partie a été laissée en contact avec FU jusqu'à la fin de l'expérience.

Un premier lot témoin est constitué par les cultures sans FU, tandis qu'un second lot témoin est constitué par les cultures dans lesquelles FU a été ajouté à partir de 1 heure après l'infection, c'est à dire dans les conditions utilisées dans toutes les expériences précédentes. Les titrages du virus et la numération des cellules ont été effectués 1 jour,

2 jours et 3 jours après l'infection.

a) Action sur la multiplication des cellules

On voit dans le tableau 17 et la figure 25, que la présence de FU dans le milieu au moment du repiquage n'empêche pas les cellules de se fixer, leur nombre étant égal à celui des cellules sans FU ; durant le 1er jour qui suit l'infection, leurs mitoses sont totalement bloquées, tandis que l'effet destructeur de l'inhibiteur est notable dès le 2e jour ; la diminution du nombre des cellules de 1 à 3 jours est la même dans les lots qui ne contiennent plus de FU dans leur milieu après y avoir été soumis pendant 24 heures, et dans les lots qui sont restés en présence de FU. Il n'y a donc aucune réversibilité spontanée de la multiplication cellulaire. Par contre, on voit (figure 25) que l'addition de 200 µ g d'uracile par ml de milieu après l'infection donc après 24 heures de contact des cellules avec FU, rétablit partiellement la multiplication cellulaire à partir du 2ème jour qui suit l'infection.

b) Action sur la production virale

Le tableau 17 montre que l'addition de FU 24 h. avant l'infection provoque une forte réduction de la production virale à 1 jour et 2 jours puisqu'elle est en moyenne de 5 à 30 fois supérieure à la réduction provoquée par l'addition de FU 1 h. après l'infection. D'autre part, on voit que la production virale 3 jours après l'infection dans les lots soumis 24 h. à l'action de FU est totalement rétablie et égale à celle du témoin. Ces faits confirment l'hypothèse émise dans le paragraphe précédent; ils démontrent que durant le premier jour qui suit le repiquage,

Tableau 17

Action de FU sur la croissance cellulaire et la production virale après son addition dans le milieu 24 heures avant l'infection.

Moment de l'addition de FU *	n° de l'expér.	Temps après infection						
		1 j.			2 j.			3 j.
		20	23	30	20	23	30	30
Témoin (4) sans FU	Virus **		100			100		100
	log.nbre cell./ boîte	6	6,08	6,05	6,1	6,20	6,17	6,3
FU de (1) - 24 h. à To (avt infection)	Virus % du témoin	6%	-	0,5%	2%	-	8%	90%
	log.nbre cell./ boîte	5,65	-	5,60	5,25	-	5,50	5,40
FU à (2) partir de 24h avant infection	Virus % du témoin	1%	1,8%	-	0,1%	1%	-	-
	log.nbre cell./ boîte	5,65	5,60	-	5,25	5,60	-	-
FU à (3) partir de 1 h. après infection	Virus % du témoin	10%	37%	9%	14%	30%	36%	39%
	log.nbre cell./ boîte	5,92	-	5,90	5,50	5,75	5,79	5,70

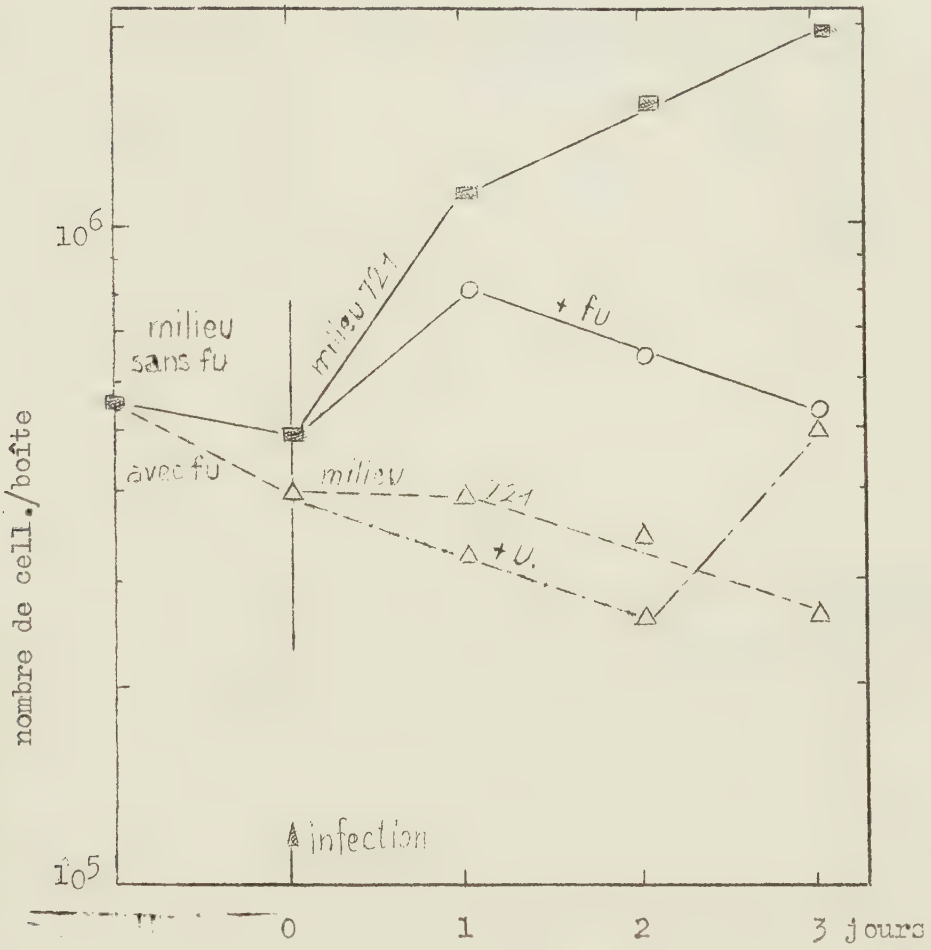
* Dans ces expériences, on a étudié comparativement, l'action inhibitrice de 20 µg/ml de FU sur la multiplication des cellules et du virus quand on l'ajoute soit 24 h. avant l'infection To, par conséquent dans le milieu au moment du repiquage, en remettant ensuite les cellules infectées dans le milieu standard pour certains lots (1), ou dans un milieu contenant le FU à la même dose (2) jusqu'à la fin de l'expérience, soit à partir de 1h. après l'infection (3).

** Les productions du virus dans les lots expérimentaux sont toutes exprimées en pourcentages par rapport au témoin sans FU, après avoir rapporté leur nombre de cellules à un nombre identique à celui des cultures témoins.

(4) Le nombre des cellules fixées au moment de l'infection dans les cultures repiquées en milieu normal était de $10^{5,68}$/boîte; dans les cultures repiquées dans le milieu contenant 20 µg/ml de FU, ce nombre était de $10^{5,60}$/boîte.

Figure 25

Action de FU (20 µg/ml) ajouté pendant 24 h. avant l'infection sur la multiplication des cellules infectées - Réversibilité par l'Uracile.



Les cellules ont été divisées en 2 lots au moment du repiquage; le premier lot (en traits pleins) a été repiqué dans le milieu standard 721 sans FU, et infecté 24 h. plus tard ; après l'infection, certaines cultures ont été conservées dans le milieu 721 (□——□) tandis que d'autres ont été mises en présence de 20 µg/ml de FU jusqu'à la fin de l'expérience (O——O).

Le second lot (en traits discontinus) a été repiqué en présence de 20 µg/ml de FU. Ce milieu a été éliminé 24 h. plus tard, les cellules ont été lavées avant d'être infectées dans les conditions standard ; après l'infection, certaines ont été remises en présence du milieu 721 (Δ- - -Δ) tandis que les autres ont été cultivées dans un milieu 721 + 200 µg/ml d'uracile (Δ—·—Δ).

Tous ces milieux ont été renouvelés tous les jours jusqu'à la fin de l'expérience. On a compté les cellules tous les jours depuis le repiquage jusqu'à 3 jours après l'infection.

Les résultats sont exprimés en log. du nombre total des cellules par boîte (moyenne de 2 boîtes).

la cellule accumule suffisamment de métabolites pour que les précurseurs des particules virales libérées 1 jour et 2 jours après l'infection soient formés à leurs dépens. De plus, la réversibilité totale de la production virale à 3 jours, qui survient bien que les cellules ne se multiplient plus et continuent même à se détruire, prouve que l'inhibition du virus de Rous par FU provient d'une action spécifique sur la synthèse des précurseurs viraux et ne résulte pas d'une action indirecte de l'inhibiteur sur le métabolisme général de la cellule infectée.

D - ETUDE DE LA REVERSIBILITE D'ACTION DE FU SUR LA MULTIPLICATION DES CELLULES INFECTEES ET NON INFECTEES ET SUR LA MULTIPLICATION DU VIRUS, PAR L'URACILE ET LA THYMIDINE

Le but essentiel que nous avons poursuivi en réalisant ces expériences est d'obtenir des renseignements complémentaires concernant le mode d'action du fluoro-uracile. Ainsi, compte tenu de ce que l'on a dit dans l'introduction de ce chapitre, la non reversibilité de l'action inhibitrice de FU sur la production virale par la thymidine d'une part, et la réversibilité partielle ou totale par l'uracile d'autre part, constitueront des arguments en faveur de la spécificité d'action du fluoro-uracile sur la synthèse de l'ARN et des protéines virales.

1 - Addition simultanée de FU et des deux bases pyrimidiques dès l'infection

Comme dans les expériences précédentes, l'infection a été effectuée un jour après le repiquage.

A l'exception des cultures témoins infectées ne contenant pas de FU, on a ajouté l'inhibiteur (20 µg/ml) dès la fin de la période d'adsorption du virus dans tous les milieux nutritifs; de plus on a ajouté simultanément au FU dans différents lots, soit 200 µg/ml d'uracile, soit 200 µg/ml de thymidine, soit les deux. Toutes ces substances ont été renouvelées tous les jours au moment du changement des milieux, et sont restées au contact des cellules jusqu'à la fin de l'expérience.

On a compté les cellules et titré le virus 1 jour, 2 jours et 3 jours après l'infection et l'addition des différents dérivés testés.

Les résultats de deux expériences typiques (n° 22 et n° 30) figurent dans le tableau 18.

a) Action sur la multiplication des cellules infectées

On voit que le nombre des cellules présentes dans les lots contenant FU et l'une ou l'autre des bases pyrimidiques normales est égal à celui des cellules contenues dans les cultures effectuées en présence de FU seul. De plus, toutes les cultures sont stationnaires de 1 à 5 jours après l'infection. Ceci démontre que l'action inhibitrice de FU sur la multiplication des cellules est irréversible, au moins dans les limites des conditions expérimentales que nous avons utilisées.

b) Action sur la multiplication du virus

Le tableau 18 et la figure 26 montrent que la production virale

Tableau 18

Action de l'addition simultanée d'uracile, de thymidine et de FU sur la multiplication des cellules infectées et sur la production virale (1).

Temps de culture après infection	n° de l'exp.	Témoin sans FU		FU (2)		FU+U (2)		FU+T (2)		FU+U+T (2)	
		22	30	22	30	22	30	22	30	22	30
1 jour	Virus % du témoin	100	100	44	9	55	4	32	-	83	-
	log. nbre cell./boîte	6,14	6,05	5,90	5,89	5,86	5,75	5,86	-	5,95	-
2 jours	Virus % du témoin	100	100	28	36	59	41	21	-	60	-
	log. nbre cell./boîte	6,40	6,17	5,87	5,80	5,84	5,75	5,95	-	5,95	-
3 jours	Virus % du témoin	-	100	-	39	-	100	-	-	-	-
	log. nbre cell./boîte	-	6,30	-	5,68	-	5,64	-	-	-	-

(1) Tous les dérivés ont été ajoutés dans le milieu de culture à partir de la fin de la période d'adsorption du virus, et laissés au contact des cellules jusqu'à la fin de l'expérience.

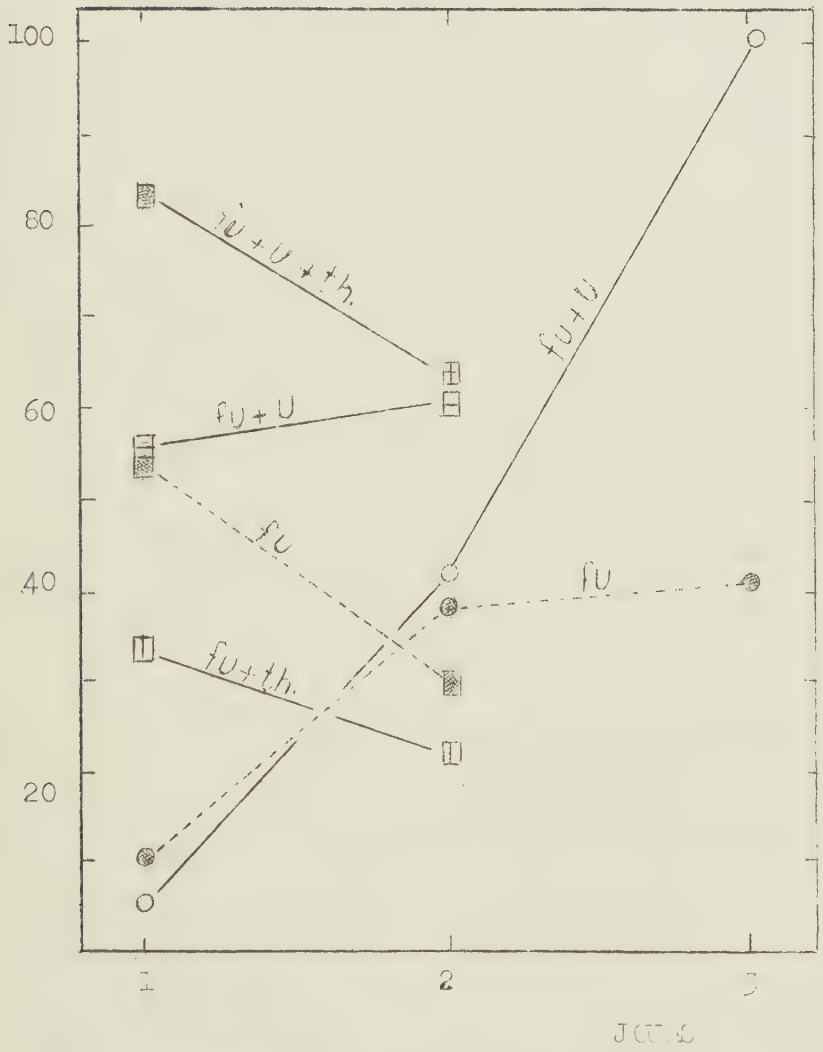
(2) Les concentrations sont de 20 µg/ml de FU, 200 µg/ml d'uracile (U) et 200 µg/ml de thymidine (T).

---

est rétablie par l'uracile partiellement 2 jours après l'infection (exp. n° 22) et totalement 3 jours après l'infection (exp. n° 30). Quant à la thymidine, non seulement elle ne rétablit pas la production du virus, mais dans certaines expériences, elle accentue la réduction de la production virale produite par FU.

Figure 26

Action de l'addition simultanée de FU (20 µg/ml) Uracile (200 µg/ml) et thymidine (200 µg/ml) sur la production virale 1j., 2j., 3 j., après l'infection



Les cultures ont été infectées 24 h. après repiquage à une multiplicité de 0,5 uP/cell. dans deux séries d'expériences différentes. L'exp. n° 22 est représentée par des rectangles, et l'exp. n° 30, par des cercles.

Après l'infection, les cultures de chaque série expérimentale ont été renouvelés tous les jours jusqu'à la fin de l'expérience :

M 721+20 µg/ml de FU (□---□)

M 721+20 µg/ml de FU (⊟——⊟)
+200µg/ml d'uracile (○——○)

M 721+20 µg/ml de FU (▥——▥)
+200µg/ml de thymidine

M 721+20 µg/ml de FU (⊞——⊞)
+200µg/ml de thymidine

On a titré le virus et compté les cellules 1 j., 2 j., et 3 j., après infection et addition de ces différents milieux.

Pour chaque expérience, on a effectué des cultures témoins en milieu 721.

Les résultats sont exprimés en pourcentages de la production virale par rapport au témoin sans FU, après avoir corrigé les titres en les rapportant à un nombre de cellules égal à celui des cultures témoins.

2 - Addition d'Uracile et de Thymidine après l'élimination de FU

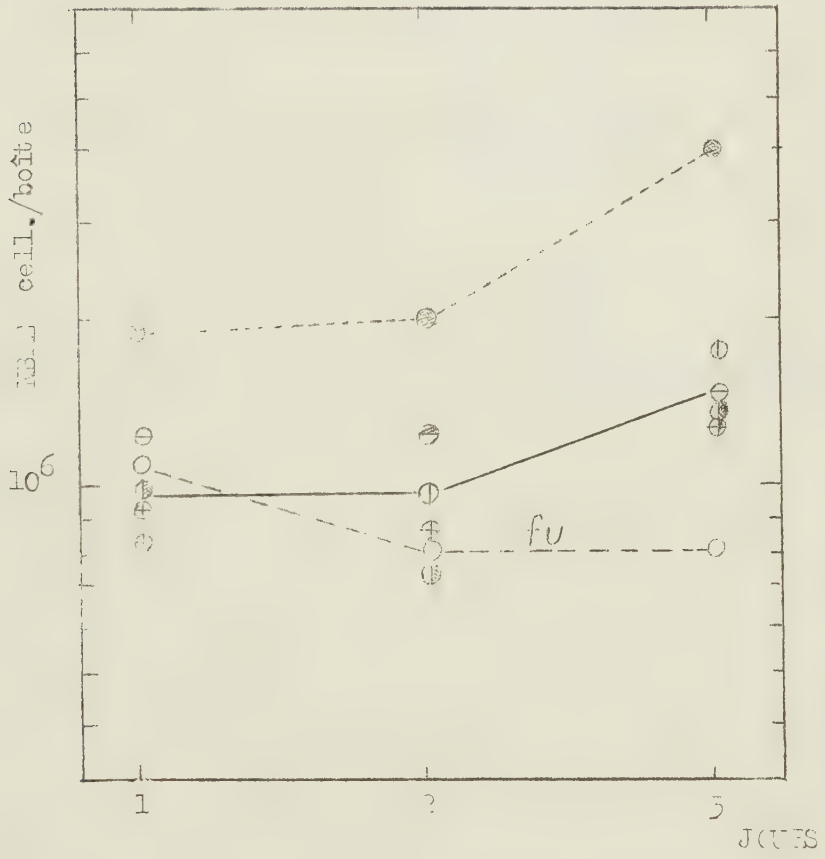
On a étudié la multiplication des cellules infectées et non infectées dans différents lots traités de la manière suivante : à partir de 24 h. après repiquage, ce qui correspond à la fin de la période d'adsorption du virus dans les cultures infectées, on a ajouté 20 µg/ml de FU qu'on a laissé au contact des cellules pendant 16 heures, à l'exception des cellules témoins cultivées en présence du milieu standard 721 . Après 16 h. de contact, le milieu contenant FU a été éliminé, les cultures ont été lavées 2 fois de suite avec le milieu M "199", et divisées en plusieurs lots : dans un premier lot, les cellules ont été remises en présence du milieu standard, dans un second lot, on a ajouté, dans le milieu 721, soit 200 µg/ml d'uracile, soit 200 µg/ml de thymidine, soit uracile et thymidine à ces mêmes concentrations. Ces différents milieux ont été renouvelés tous les jours, et l'on a compté les cellules et titré le virus tous les jours durant 3 jours après l'infection ou le repiquage.

a) Action sur la multiplication des cellules

On voit, dans les tableaux 19 ét 20 et dans la figure 27, que le nombre des cellules infectées et non infectées est le même dans tous les lots, qu'il y ait ou pas de l'uracile ou de la thymidine dans le milieu. Cependant, il est possible que si l'on avait prolongé le temps de contact avec l'uracile, on aurait constaté une réversibilité partielle de la multiplication cellulaire. En effet, les numérations faites 1 jour, 2 jours et 3 jours après infection ou repiquage, correspondent en fait à des temps de contact des cellules avec les 2 bases normales de 8 h., 32 h., et 56 h., après l'élimination du fluoro-uracile. Or, si l'on se reporte à l'expérience

Figure 27

Action de l'addition d'uracile et de thymidine sur la multiplication des cellules infectées, après élimination de FU



On a infecté une série de cultures 24 heures après repiquage à une multiplicité de 0,2 UP/cell. Après l'infection, et à l'exception des cultures témoins, qui ont été effectuées dans les conditions standard (●----------●) toutes les autres cultures ont été mises en présence du milieu + 20 µg/ml de FU pendant 16 h.

Après 16 h. de contact, le milieu contenant FU a été éliminé, et l'on a constitué plusieurs lots que l'on a mis en présence de différents milieux

- Milieu 721 + 20 µg/ml de FU (○ ------- ○)
- " " + 200 µg/ml d'uracile (◐)
- " " + 200 µg/ml de thymidine (◑)
- " " + {200 µg/ml d'uracile et 200 µg/ml de thymidine (⊕)

On a compté les cellules tous les jours de 1 à 3 jours après l'infection. Les résultats sont exprimés en log. du nombre total des cellules par boîte.

représentée dans la figure 25, au cours de laquelle une partie des cultures a été soumise à l'action de FU pendant 24 h. avant l'infection, on voit qu'il y a une certaine réversibilité de la multiplication des cellules par l'uracile, 3 jours après l'élimination de FU.

b) Action sur la multiplication du virus

Les résultats sont rapportés dans le tableau 19 et la figure 28.

Tableau 19

Action de l'addition d'uracile et de thymidine sur la croissance des cellules infectées et sur la production virale après l'élimination de FU (exp.n° 28)

Temps après infection	Milieu utilisé de To à 16h (1) / Milieu utilisé après 16h. (3)	M 721 / -	M 721+FU / -	Milieu + FU (2)			
				Milieu Standard	Uracile	Thymidine	Uracile + Thymidine
1 j.	Virus % du témoin	100	11	33	75	27	24
	log. nbre cell./boîte	6,28	6,05	6	5,90	6,08	5,98
2 j.	Virus % du témoin	100	31	43	-	<1	3
	log. nbre cell./boîte	6,28	5,91	5,86	6	6,08	5,90
3 j.	Virus % du témoin	100	58	100	85	21	100
	log. nbre cell./boîte	6,60	5,90	6,15	6,25	6,15	6,15

Dans ces expériences on a fait agir FU dans tous les lots à l'exception de la série témoin M 721, pendant 16 h. après l'infection. On a ensuite remis les cellules soit en présence du milieu standard, soit dans un milieu contenant FU, ou uracile, ou thymidine, ou uracile + thymidine.

(1) To correspond à la fin de la période d'adsorption du virus.

(2) La concentration de FU est de 20 µg/ml.

(3) Les concentrations de l'uracile et de la thymidine sont de 200 µg/ml chacune, qu'elles soient ajoutées séparément ou simultanément.

Tableau 20

Action de l'addition d'uracile et de thymidine sur la multiplication des cellules non-infectées (1) après élimination de FU

Temps après addition de FU	Témoin sans FU	FU de To à 16 h. (2)			
		Milieu standard	Uracile	Thymidine	Uracile + thymidine
1 j.	6,19	5,90	5,93	6	6,08
2 j.	6,43	5,86	5,92	5,92	6
3 j.	6,63	5,92	6,05	5,93	6,13

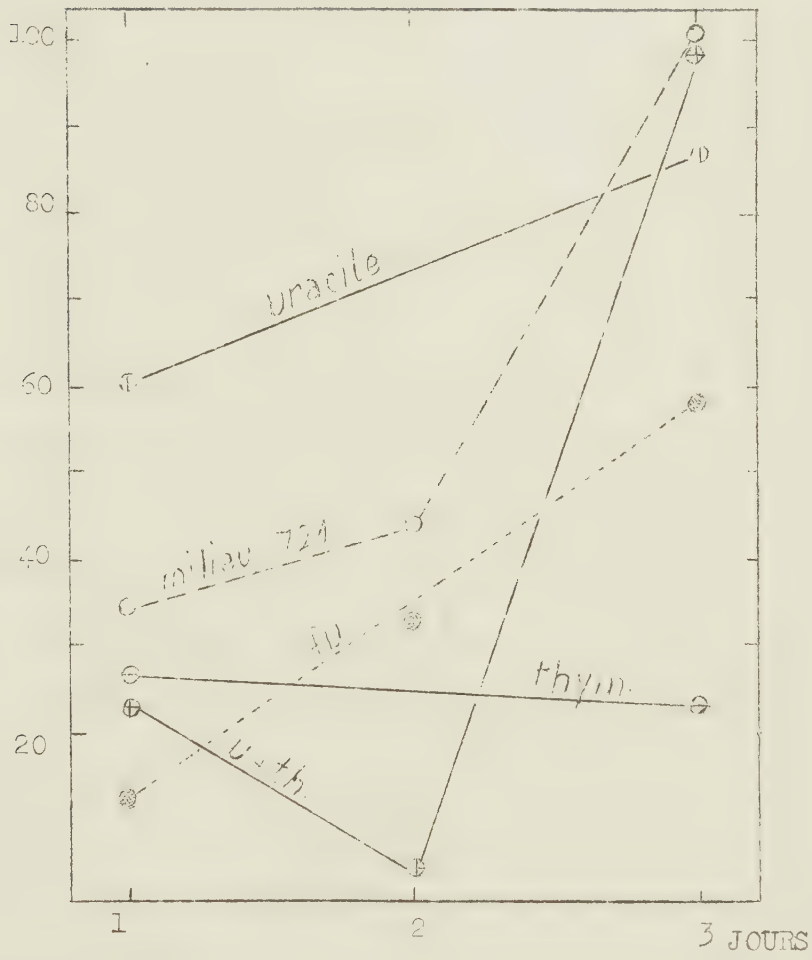
(1) Tous les résultats sont exprimés en log. du nombre de cellules par boîte.

(2) Comme dans les cultures infectées du tableau 19, 20 µg/ml de FU ont été laissés au contact des cellules pendant 16 h. à partir du premier jour qui a suivi le repiquage, c'est-à-dire à partir du moment correspondant au temps 0(To) de l'infection des séries infectées du tableau 19. Après le contact avec FU, les cellules ont été remises soit en présence du milieu standard, soit dans un milieu contenant 200 µg/ml d'uracile ou de thymidine, ajoutées séparément ou simultanément.

Comme on pouvait le prévoir, compte tenu des résultats obtenus lors des expériences précédentes (paragraphe C), les 16 heures préliminaires de contact des cellules infectées avec FU provoquent une réduction de la production virale un jour et deux jours après l'infection ; par contre, la production virale à 3 jours n'est pas réduite. On voit que la présence de l'uracile dans le milieu de culture après l'élimination de FU rétablit partielle-

Figure 28

Action de l'addition d'uracile et de thymidine sur la production virale à 1 j., 2 j., et 3 j., après l'élimination de FU



C'est la même expérience que celle décrite dans la fig. 27. Tous les lots, à l'exception du témoin, ont été mis en contact avec 20 µg/ml de FU pendant les 16 premières heures qui ont suivi l'infection.

A partir de 16 h. après avoir éliminé le milieu contenant FU, on a ajouté suivant les lots :

- soit 20 µg/ml de FU (●——●)
- soit 200 µg/ml d'uracile (◐)
  200 µg/ml de thymidine (⊖)
  200 µg/ d'uracile et 200 µg de thymidine par ml (⊕)

Le témoin a été remis en présence du milieu 721 (○ --- ○). On a titré le virus 1 j., 2 j., et 3 j. après l'infection.

Les résultats sont exprimés en pourcentages de la production virale par rapport aux cultures effectuées dans le milieu standard, après avoir corrigé les titres pour un nombre de cellules égal à celui des cultures témoins.

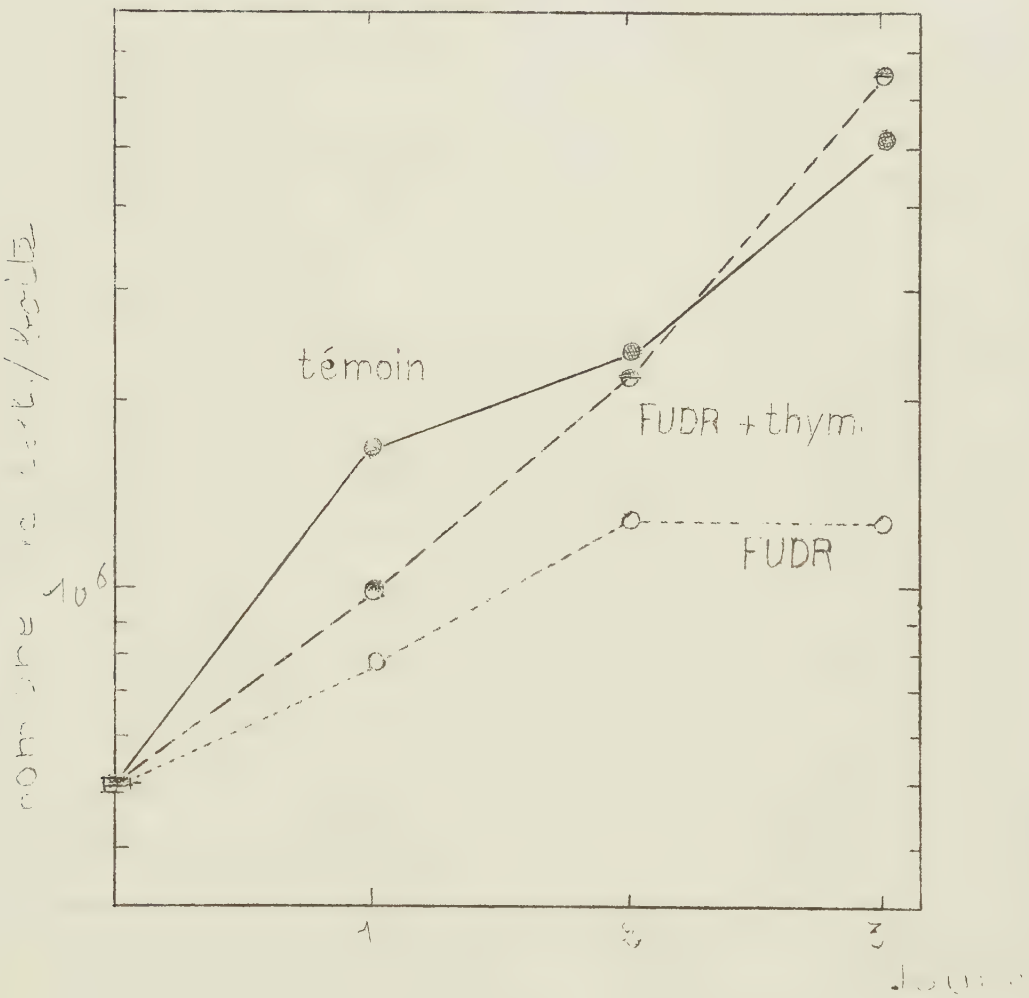
ment la production des particules infectieuses libérées un jour et deux jours après l'infection, alors que la thymidine paraît au contraire accentuer la réduction de la production virale provoquée par le fluoro-uracile. De plus, on constate que la présence de la thymidine dans le milieu réduit la production des particules libérées trois jours après l'infection, alors que les cultures effectuées parallèlement, soumises à l'action de FU pendant 16 heures et remises en présence du milieu normal, ont une production égale à celle des cultures infectées témoins (sans FU); l'uracile semble annuler cet effet inhibiteur de la thymidine quand les deux dérivés sont ajoutés simultanément.

Devant cette action particulière de la thymidine, on a réalisé une série d'expériences afin de vérifier si la substance utilisée n'était pas toxique. Dans ces expériences, on a divisé une série de cultures non infectées en 3 lots, 24 h. après le repiquage : le premier lot a été cultivé en présence du milieu normal, le second lot en présence du milieu + 20 µg/ml de FUDR et le troisième lot, en présence du milieu + 20 µg/ml de FUDR + 200 µg/ml de thymidine. On a compté les cellules 1 jour, 2 jours, et 3 jours après l'addition de ces différents milieux.

Les résultats sont représentés dans la figure 29. Comme on l'a vu dans la première partie de ce chapitre, FUDR réduit beaucoup la multiplication des cellules qui restent stationnaires à partir du 2e jour. Par contre, on constate que la thymidine rétablit la multiplication des cellules dès le premier jour, de telle manière qu'à deux jours, les cultures témoins et les cultures effectuées en présence de FUDR + thym' contiennent les mêmes nombres de cellules. Ceci démontre que la thymidine utilisée n'est pas toxique et qu'elle renverse totalement l'action de FUDR sur la multiplication cellulaire.

Figure 29

Réversibilité par la thymidine de l'action de FUDR sur la multiplication des cellules non infectées



Un jour après le repiquage, des cultures non infectées ont été divisées en 3 lots ; le 1er a été cultivé dans les conditions standard (●——●) ; le 2ème en présence de milieu + 20 µg/ml de FUDR et le 3ème, en présence de milieu + 20 µg/ml de FUDR + 200 µg/ml de thymidine.

Le rectangle sur l'axe des ordonnées (▭) représente le nombre des cellules présentes dans chaque boîte au moment où on a ajouté les différents milieux.

On a compté les cellules tous les jours jusqu'à 3 jours après le repiquage.

Les résultats sont exprimés en log. du nombre total des cellules par boîte (chaque point est la moyenne de 2 boites).

DISCUSSION

Les expériences que nous venons de décrire ont eu pour but d'abord de préciser le mode d'action du fluoro-uracile et de la fluoro-désoxyuridine sur la synthèse des acides nucléiques et la multiplication des cellules de poulet infectées et non infectées ; ensuite, de déterminer la nature de l'acide nucléique viral d'après l'action respective de ces deux dérivés sur la production du virus ; puis d'étudier avec le dérivé actif, la cinétique de la synthèse des précurseurs destinés à constituer les particules infectieuses.

Considérons d'abord l'action de FU et FUDR sur la multiplication des cellules. Dans l'ensemble, l'action inhibitrice de la multiplication cellulaire de chacun des deux dérivés est plus marquée et plus précoce pour les cellules infectées que pour les cellules non infectées ; ceci peut provenir d'une plus grande vitesse d'incorporation due à la plus grande perméabilité ou à un métabolisme plus actif des cellules infectées. La fluorodesoxyuridine agit sur les cellules de poulet comme sur toutes les autres cellules animales (Rich et Coll. 1960), c'est-à-dire que l'arrêt de la multiplication cellulaire est provoqué par un arrêt de la synthèse de l'ADN. La réversibilité totale de cette action par la thymidine démontre que l'inhibition provient d'un blocage des chaînes de réactions aboutissant à la synthèse de la thymidine de l'ADN, comme nous l'avons dit dans l'introduction.

L'action du fluoro-uracile est plus complexe. On a constaté que la multiplication des cellules de poulet est inhibée dès les plus faibles

doses utilisées, ce qui est en accord avec les résultats de Rich, Stonehill et Eidinoff (1960). Différentes études effectuées in vivo et in vitro sur des cellules de mammifères (voir introduction) ont montré que cet inhibiteur peut agir sur la synthèse de l'ADN soit en empêchant les réactions de méthylation aboutissant à la synthèse de la thymidine, et cette action est alors réversible par la thymine ou la thymidine (Rich, Saslaw et Eidinoff 1960), soit en provoquant la formation d'ARN ou de protéines aberrantes. Le fait que ni l'addition d'uracile, ni celle de thymidine, ni celle de ces deux bases en même temps que FU, ne rétablisse la multiplication des cellules de poulet, suggère qu'il peut y avoir formation de produits intermédiaires fluorés, inhibant irréversiblement l'activité de certaines enzymes nécessaires à la synthèse de l'ADN comme dans diverses souches de cellules humaines (Rich et Coll. 1958-1960) ou dans les bactéries (Cohen et coll. 1958). L'observation que l'uracile ne rétablit pas la multiplication des cellules semble être en contradiction avec les faits rapportés par Rich, Stonehill et Eidinoff (1960) lesquels concluent à la réversibilité d'action de FU par l'uracile sur la multiplication des cellules. Cette contradiction est due aux méthodes différentes employées dans les deux cas pour apprécier la multiplication des cellules. En effet, alors que nous avons mesuré réellement la multiplication des cellules en les comptant, les auteurs cités précédemment ont dosé les protéines totales par culture. Compte tenu des résultats des dosages des protéines que nous avons effectués au cours d'expériences ultérieures (chapitre V), nous ne pensons pas qu'il soit possible d'apprécier la multiplication d'après la teneur en protéines de la population cellulaire, cette teneur pouvant augmenter sans correspondre à une augmentation du nombre des cellules. C'est pourquoi il

est vraisemblable que l'augmentation des quantités de protéines contenues dans les cellules cultivées en présence de FU + U constatée par Rich et coll. correspond à une réversibilité de l'action du fluoro-uracile sur la synthèse de l'ARN et des protéines, et non à une réversibilité de l'action sur les mitoses.

Ces résultats suggèrent donc que le fluoro-uracile agit principalement sur la multiplication et le métabolisme des cellules de poulet infectées ou non infectées en perturbant le métabolisme de l'ARN et des protéines. Il est possible que la toxicité de cet inhibiteur, qui provoque une destruction partielle de la population cellulaire après plusieurs jours de contact soit due à l'accumulation de certains précurseurs entraînant un choc osmotique, tels que ceux de la membrane, comme Tomasz et Borek (1960) l'ont vu dans les bactéries soumises à l'action de FU. Cela pourrait aussi expliquer la plus grande fragilité des cellules productrices de virus après l'action de la trypsine quand on les décolle et les inocule pour les titrer.

Ce que nous venons de voir à propos du mode d'action de FU et FUDR sur les cellules nous permet d'interpréter les résultats obtenus au cours des expériences d'inhibition de la production virale.

I - Le fait que FUDR n'inhibe pas la production virale, tandis que FU l'inhibe dans certaines conditions, prouve que l'acide nucléique viral est un ARN (Goldé et Vigier 1960) ; ceci a été confirmé récemment par Rich, Perez et Eidinoff (1962). De plus, étant donné que les deux dérivés bloquent la synthèse de l'ADN, ce qui n'empêche pas le virus de se multiplier en leur présence dans les cellules de poulet converties en cellules de Rous depuis plus de trois jours, on peut dire que la synthèse d'un ADN nouveau ne sem-

ble pas indispensable à la réplication de l'ARN viral. Cette conclusion rejoint celle de Simon (1961). Cet auteur fonde son argumentation sur des résultats obtenus en faisant agir le fluoro-uracile sur des cellules infectées par un virus à ADN (vaccine) et par deux virus à ARN (maladie de Newcastle NDV - et poliomyélite). Il démontre que la synthèse d'un ADN cellulaire nouveau n'est pas nécessaire à la synthèse de virus dont le matériel génétique est un ARN, en se basant sur le fait que la production de ces derniers n'est pas affectée par FU. Or, nous considérons que l'inhibition du virus de Rous par FU confirme la nature ARN de son information génétique. Cette apparente contradiction peut s'expliquer, si l'on tient compte des doses différentes employées dans les deux cas. Simon utilise en effet 5 µg/ml de FU, aussi bien dans les cultures infectées par le virus de la vaccine que par le NDV et le virus de la poliomyélite. Il constate que seule la production du virus à ADN est inhibée. Il semble que ceci soit explicable de la façon suivante : on a constaté, au cours des expériences portant sur l'action de doses croissantes de FU ajoutées au moment de l'infection des cellules par le virus de Rous, qu'aux concentrations les plus faibles (1 µg et 5 µg/ml), seule la multiplication cellulaire est réduite, la production virale restant normale. D'autre part, Kaplan et Ben Porat (1960) ont montré que la production du virus de la pseudo-rage, à ADN, est réduite par l'addition de 1 µg/ml de FU mais est rétablie par la thymidine, démontrant ainsi que l'inhibition du virus provient bien dans ces conditions de l'inhibition de la synthèse de l'ADN viral. Il semble donc que l'action la plus rapide et la plus marquée de FU aux faibles doses est l'inhibition de la synthèse de l'ADN, ce qui permet de comprendre pourquoi, à

ces doses les plus faibles, la production des virus à ARN n'est pas réduite tandis que celle des virus à ADN l'est d'une façon notable.

Aux doses supérieures (20 à 25 µg/ml), le fluoro-uracile réduit la production des virus à ARN, comme nous l'avons constaté dans nos expériences; ce fait est en accord avec les résultats rapportés par Sanders (1960) qui a inhibé la synthèse des précurseurs du virus de l'encéphalomyocardite (EMC), à ARN, en faisant agir 20 µg/ml de F U sur les cellules infectées. Par ailleurs, à ces doses, le fluoro-uracile peut réduire la production d'un virus à ADN en inhibant la synthèse, ou en modifiant la structure d'un ARN nécessaire à la synthèse des protéines virales (Tanami et coll. 1962 - virus de la psittacose). Ces faits suggèrent que le fluoro-uracile n'agit d'une façon notable sur le métabolisme de l'ARN et des protéines qu'à des doses relativement élevées.

En ce qui concerne les cellules infectées par le virus de Rous, le fait que la production soit normale quand on ajoute simultanément le fluoro-uracile et l'uracile confirme que l'inhibiteur ajouté seul réduit bien la production des particules infectieuses en se substituant à la base pyrimidique normale au cours des réactions aboutissant à la synthèse de l'ARN. D'autre part, l'effet de la thymidine, qui accentue l'action inhibitrice du fluoro-uracile sur la production virale pourrait s'expliquer de la façon suivante : étant donné que FU inhibe vraisemblablement la synthèse de l'ADN cellulaire, il est probable que la thymidine rétablit partiellement cette synthèse; les mitoses resteraient néanmoins bloquées par suite de l'inhibition de la synthèse de certaines protéines indispensables à la division des cellules. Dans ces conditions il peut y avoir compétition dans

l'utilisation des précurseurs cellulaires, les nucléotides notamment, pour la synthèse de l'ADN cellulaire d'une part et la synthèse de l'ARN viral d'autre part, laquelle serait par conséquent réduite. L'addition simultanée de l'uracile, qui semble annuler cette action particulière de la thymidine, favoriserait au contraire les chaînes de réactions conduisant à la synthèse de l'ARN viral au détriment de l'ADN cellulaire.

2 - L'addition de la dose optimum de fluoro-uracile dans des conditions variées nous a permis de préciser la cinétique de la synthèse du matériel viral (ARN et protéines) dans les cellules infectées par le virus de Rous. On a vu, dans le chapitre II, que bien que toutes les cellules soient infectées au cours de l'infection initiale à multiplicité élevée, le nombre maximum des centres infectieux n'est atteint que quatre ou cinq jours après l'infection. Ceci démontre que la période d'éclipse du virus dans les cellules infectées d'une même population cellulaire peut avoir une durée comprise entre 12 heures et cinq jours. L'emploi du fluoro-uracile nous a permis de constater que ce phénomène est dû à un déphasage dans la capacité qu'ont les cellules d'une culture à commencer à synthétiser les précurseurs viraux.

Ainsi, on a vu que les précurseurs des particules libérées un jour et deux jours après l'infection sont synthétisés durant la période d'éclipse initiale, laquelle correspond donc en fait à la période d'éclipse du virus dans les cellules détectées comme centres infectieux à un jour et deux jours. A cette occasion, on peut dire que le fait que la production virale est réduite au maximum quand FU est ajouté dans le milieu de culture 24 heures avant l'infection démontre que les premiers précurseurs du virus sont

synthétisés aux dépens des métabolites cellulaires présents au moment de l'infection. Ceci a été observé également dans les cellules infectées par le virus de la poliomyélite (Eagle et Habel, 1956; Darnell et Levintow, 1960; Diamond et Balis, 1961).

Quant aux éléments précurseurs destinés à entrer dans la constitution des particules libérées à trois, quatre et cinq jours, nos résultats montrent qu'ils sont synthétisés entre 16 heures et trois jours après l'infection.

Compte tenu de ces résultats, un calcul basé sur le raisonnement suivant montre que le délai entre la synthèse du matériel viral et la libération des particules infectieuses qui le renferment augmente au fur et à mesure que le temps depuis l'infection croît : on a vu que la durée minimum de la période d'éclipse est de 12 heures, c'est-à-dire que les premières particules infectieuses sont détectées dans le milieu de culture 12 h. après l'infection ; or, étant donné l'inactivation thermique rapide du virus de Rous à 37°, ces particules, pour être encore infectieuses au moment du prélèvement, ont dû être libérées au plus tôt 3 heures auparavant, c'est-à-dire 9 heures après l'infection. D'autre part, si l'on tient compte du fait que les précurseurs des particules libérées 24 heures après l'infection sont synthétisés durant les 5 premières heures de la période d'éclipse, on peut admettre que le matériel viral incorporé dans les particules libérées 9 heures après l'infection a été synthétisé pendant les deux premières heures qui ont suivi l'infection ; par conséquent, le délai entre la synthèse des précurseurs et la libération des particules correspondantes est de 9h-2h=7h. Ce délai est du même ordre de grandeur que celui observé dans les cellules infectées par le virus de l'EMC à ARN (Sanders, 1960) ou par le virus de

la vaccine à ADN (Salzman, 1960).

Dans notre système, le même raisonnement appliqué aux particules infectieuses titrées ultérieurement montre que ce délai augmente : il a une durée de 16 heures pour le virus produit un jour après l'infection, de 35 heures pour le virus produit deux jours après l'infection, et de 40 à 48 heures pour le virus produit trois jours après l'infection (figures 17 et 18). Ceci suggère qu'il y a un ralentissement soit de la vitesse de synthèse des protéines virales soit de la vitesse avec laquelle les différents constituants viraux se rassemblent en un site de la cellule pour former les particules mures.

On a constaté qu'à partir du 3e jour après l'infection, l'addition du fluoro-uracile dans le milieu de culture ne réduit plus la production du virus libéré pendant les jours suivant, c'est-à-dire pendant 10 jours dans nos expériences. Ceci explique pourquoi Fairman (1960) n'a pas observé de réduction du titre du virus libéré par des cellules de Rous âgées de plusieurs semaines et soumises à l'action de l'inhibiteur pendant quelques jours. Ce fait constitue une des particularités les plus remarquables du système cellule-virus de Rous. Des résultats similaires n'ont évidemment pu être rapportés lors de l'emploi des inhibiteurs au cours de la multiplication in vitro des virus cytodestructeurs étant donné que les cellules infectées par ces virus sont détruites rapidement. Cependant, la réduction de la production du virus sigma de la drosophile par FUDR présente in vivo la même particularité (L'Héritier, communication personnelle); c'est-à-dire que l'analogue ne réduit plus la production virale dès que le palier d'équilibre du cycle de multiplication du virus est atteint.

En ce qui concerne les cellules de Rous, le fait qu'on ne peut plus réduire la production virale lorsqu'on ajoute le fluoro-uracile au-delà de trois jours après l'infection signifie que les particules infectieuses libérées ultérieurement renferment un ARN et des protéines synthétisées normalement aux dépens de précurseurs dépourvus de FU. On peut envisager plusieurs hypothèses pour expliquer cette particularité :

- la première hypothèse est que les cellules de poulet converties en cellules de Rous n'incorporent plus le fluoro-uracile à partir du 3e jour après l'infection. Cette explication pourrait être valable pour les cellules infectées qui, ne se multipliant plus par suite de la confluence survenue vers le 3e ou le 4e jour, ont certainement un métabolisme diminué et peuvent n'incorporer que des quantités réduites de FU. Cependant, elle n'est plus valable si l'on considère des cellules de Rous repiquées récemment, et par conséquent en période de multiplication active. En effet, les résultats d'expériences rapportées dans ce chapitre montrent que l'addition de FU dans le milieu des cultures repiquées provoque un arrêt de la multiplication cellulaire; l'inhibiteur a donc bien été incorporé par les cellules. Etant donné que la production virale n'est pas réduite, nous pensons que cette première hypothèse peut être éliminée.

- deux autres hypothèses nous sont suggérées par les résultats des dosages de l'ARN, des nucléotides acido-solubles et des protéines effectués ultérieurement (chapitre V), et qui montrent la présence d'un excès de chacun de ces métabolites dans les cellules infectées par rapport aux quantités présentes dans les cellules non infectées. On peut supposer que cet excès, en particulier celui de l'ARN et des nucléotides, est formé soit d'un matériel spécifique du virus, soit de réserves normales utilisa-

sables par les cellules pendant un certain temps pour effectuer la synthèse du matériel viral.

Dans le premier cas, s'il y a effectivement dans les cellules infectées une réserve de précurseurs viraux qui se constitue durant les premiers jours qui suivent l'infection, le fluoro-uracile ne pourra évidemment s'y incorporer, et les particules infectieuses seront produites normalement en sa présence au moins pendant un certain temps. Les résultats des dosages nous permettent de calculer (chapitre V) que si les quantités d'ARN et de nucléotides en excès correspondent à du matériel viral, elles peuvent entrer dans la constitution des particules produites par les cellules d'une culture pendant 10 à 20 jours. Dans ces conditions, si l'on admet qu'il y a un renouvellement régulier du matériel viral pour l'ensemble de la population cellulaire en 10 à 20 jours, cela signifie que chaque jour, en moyenne, 10% ou 5% de ce matériel viral sont synthétisés et incorporent le fluoro-uracile. La réduction correspondante du titre du virus passerait alors inaperçue étant donné l'erreur relative des méthodes de titrage employées ($\pm$ 10 à 15%).

Dans le second cas, si les cellules infectées accumulent des métabolites normaux avant l'addition du fluoro-uracile, on peut supposer qu'elles les utilisent ensuite préférentiellement pour effectuer la synthèse du matériel viral, même en présence de l'inhibiteur. Dans ces conditions, les réserves de métabolites normaux doivent s'épuiser au fur et à mesure que la durée du contact avec FU augmente, et l'inhibiteur doit se substituer à l'uracile dans un nombre croissant de molécules de nucléotides ou d'ARN,

et doit modifier la structure ou inhiber la synthèse d'un nombre croissant de molécules protéiques; après un certain temps, on devrait par conséquent, observer une réduction de la production virale. Si cette hypothèse est correcte, compte tenu des résultats des dosages, les réserves de métabolites, en particulier d'ARN, constituées dès le 3e jour qui suit l'infection, seraient suffisantes pour permettre à la cellule de synthétiser les précurseurs nécessaires à la constitution des particules produites pendant 10 jours. Théoriquement, il suffirait, pour vérifier cette hypothèse, de cultiver des cellules infectées en présence de FU pendant 8 à 10 jours environ ; à ce moment, la majorité des molécules de précurseurs auraient incorporé l'analogue, provoquant une réduction de la production virale. Malheureusement, on se heurte pratiquement à la difficulté que constitue la toxicité du fluoro-uracile, notable dès le 3e jour de contact avec les cellules, et les résultats obtenus dans de telles conditions n'auraient que peu de signification.

Par quel mécanisme le fluoro-uracile réduit-il la production virale quand on le fait agir sur les cellules infectées durant les trois premiers jours qui suivent l'infection ?

Etant donné que le fluoro-uracile peut se substituer à l'uracile dans les molécules d'ARN cellulaire (Chaudhuri et coll. 1958), on peut penser qu'il y a parallèlement synthèse d'un ARN viral aberrant renfermant FU; par conséquent, un tel ARN pourrait entrer dans la constitution de particules virales inactives. C'est cette hypothèse qu'à suggérée Sanders pour expliquer l'inhibition de la production du virus de l'EMC par FU. D'autre part, par analogie avec ce qui a été vu dans les bactéries cultivées en présence de FU (voir Gros et Naono, 1960), on peut supposer qu'il y a inhibition

de la synthèse, ou modification de la structure de certaines protéines enzymatiques nécessaires à la réplication de l'ARN viral. Enfin, la synthèse des protéines formant les capsides peut être elle-même inhibée ou modifiée de telle manière que les particules les renfermant seraient inactives.

Aucun fait ne permet actuellement de choisir l'une plutôt que l'autre des hypothèses que nous venons d'évoquer; il est vraisemblable que seul l'emploi des éléments radio-actifs résoudrait le problème posé par l'action du fluoro-uracile sur la production du virus par les cellules de Rous.

II - ACTION DE LA FLUORO-PHENYLALANINE (FPA) SUR LA MULTIPLICATION DES CELLULES ET DU VIRUS

L'introduction d'analogues d'amino-acides dans les cellules infectées par un virus peut donner des renseignements sur la cinétique de la synthèse des protéines virales, en inhibant la production des particules infectieuses. C'est dans ce but, et pour compléter les renseignements fournis par l'emploi du fluoro-uracile sur la synthèse de l'ARN viral, que nous avons utilisé la p-fluoro-phénylalanine (FPA). Cet analogue se substitue à la phénylalanine durant la synthèse protéique (Halvorson et Spiegelman, 1952 ; Cohen et Munier, 1959; Munier et Cohen, 1959); par conséquent, il inhibe la synthèse virale quand on le fait agir sur des cellules infectées par un virus. C'est ainsi que son action a été étudiée in vitro sur la production du virus de la poliomyélite (Ackermann, Rabson, et Kurtz 1954), de la grippe (Ackermann et Maassab, 1955) et de la peste aviaire (Zimmermann et Schäfer, 1960). Dans l'ensemble, la production virale est d'autant plus réduite que FPA a été ajoutée plus tôt après l'infection. Les résultats que nous avons obtenus démontrent qu'il en est de même pour le virus de Rous libéré précocément. Cependant, étant donné que nous avons affaire à des cellules qui produisent constamment de petites quantités de virus, les phénomènes que nous avons observés apparaissent plus complexes que dans le cas des virus cyto-destructeurs.

1 - EXPERIENCES

Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles décrites dans le premier paragraphe de ce chapitre. Le processus expérimental est également le même que celui utilisé au cours des expériences d'inhibition par FU et FUDR. On a d'abord déterminé la dose optimum qui inhibe la production virale sans provoquer de destruction cellulaire notable; puis on a ajouté cette dose à divers moments du cycle de multiplication du virus.

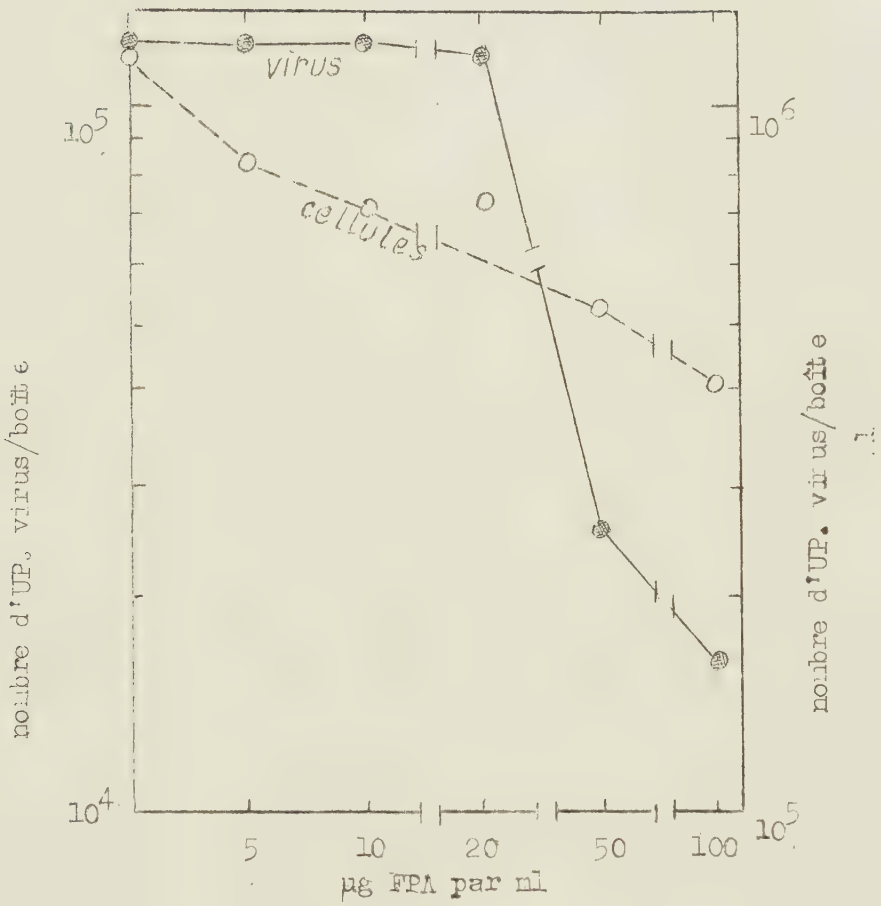
a) Action de doses croissantes de FPA ajoutées au début de la période d'éclipse

Des doses de 5, 10, 20, 50 et 100 µg/ml de FPA ont été ajoutées dans le milieu de culture dès la fin de la période d'adsorption du virus et laissées au contact des cellules jusqu'à la fin de l'expérience.

La figure 30 montre que de 5 à 50 µg/ml, la FPA réduit la multiplication de la population cellulaire totale ; à partir de 50 µg/ml les mitoses sont bloquées, le nombre des cellules à 2 jours étant égal au nombre des cellules présentes au moment de l'addition de l'inhibiteur. D'autre part, on voit que les doses de 5, 10 et 20 µg ajoutées dès le début de l'infection n'inhibent pas la production du virus à 2 jours. Ce n'est qu'à partir de 50 µg/ml qu'on observe une inhibition importante de la production virale. C'est cette dose que nous avons choisie pour effectuer les expériences ultérieures.

Figure 30

Action de doses croissantes de FPA ajoutées 1 heure après le début de l'infection sur la multiplication des cellules et du virus *



* On a compté les cellules et titré le virus contenu dans les milieux de cultures 2 jours après l'infection.

Les résultats sont exprimés en log. du nombre des cellules (echelle de droite) et en log. du nombre d'UP de virus (échelle de gauche) par boîte. Les titres du virus dans les lots contenant FPA ont été rapportés à un nombre de cellules égal à celui des cultures témoins sans FPA.

b) Action de la FPA (50 µg/ml) ajoutée à divers moments de la période d'éclipse sur la multiplication des cellules et du virus

50 µg/ml de FPA ont été ajoutés 1 h., 3 h., 5 h., 7 h., après le début de l'infection, c'est-à-dire pendant la première moitié de la période d'éclipse. Un lot de cultures a été laissé au contact de l'inhibiteur jusqu'à la fin de l'expérience, et un témoin sans FPA a été infecté et cultivé parallèlement. Les milieux ont été renouvelés tous les jours; on a compté les cellules et titré le virus 1 jour et 2 jours après l'infection.

La figure 31 et le tableau 21 montrent que la production virale 1 et 2 jours après l'infection est d'autant plus réduite que FPA a été ajoutée plus tôt durant l'éclipse.

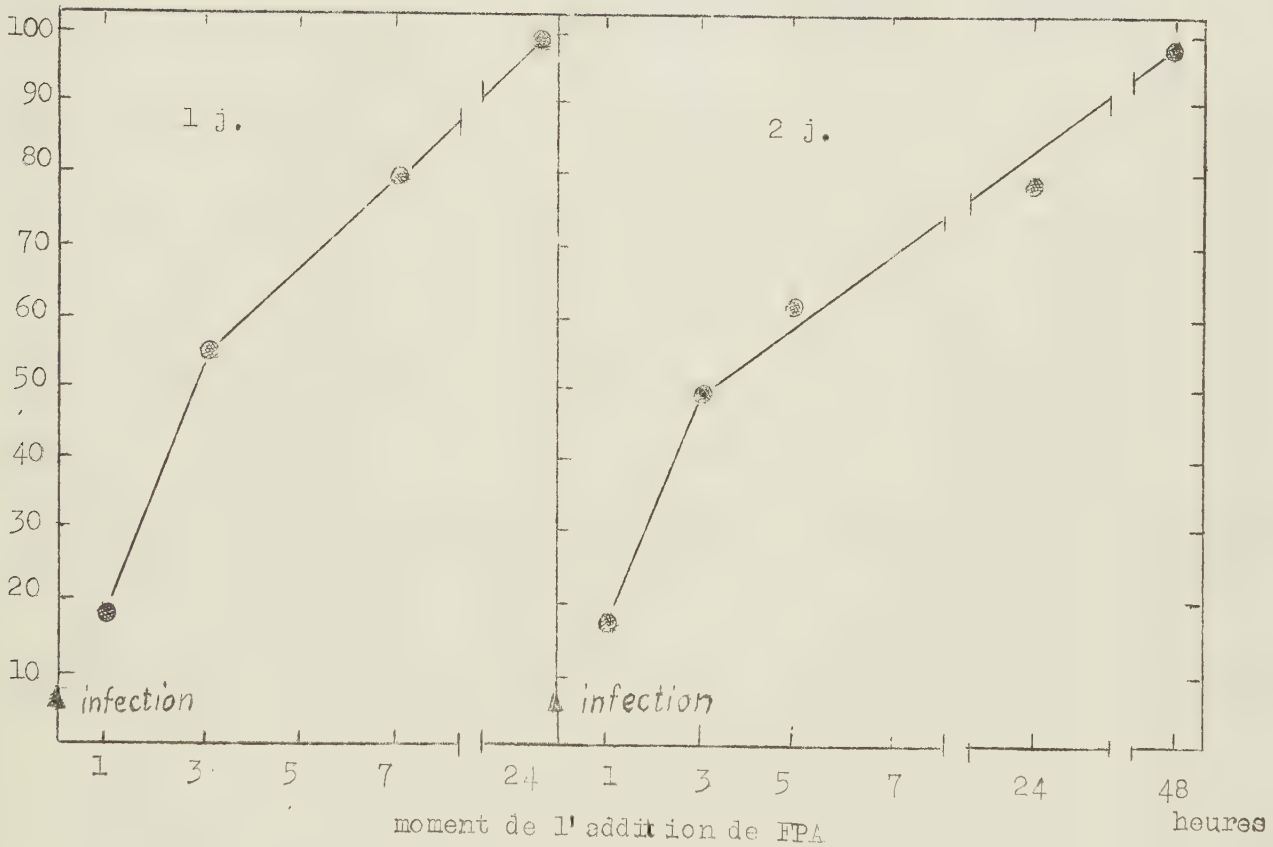
c) Action de la FPA ajoutée 1 j., 2 j., et 3 j. après l'infection sur la production virale d'une semaine

On a ajouté 50 µg/ml de FPA 1 h., 1 jour, 2 jours et 3 jours après l'infection dans des lots de cultures différentes repiquées et infectées en même temps. On a compté les cellules et titré le virus tous les jours pendant les trois jours qui ont suivi, pour chaque lot, l'addition de l'inhibiteur.

On voit dans le tableau 21 que l'addition de la FPA 1 jour et 2 jours après l'infection ne réduit que peu la production du virus libéré 1 jour, 2 jours et 3 jours plus tard. Par contre, lorsqu'on ajoute l'inhibiteur 3 jours après l'infection, la réduction du titre du virus produit 1 jour et 3 jours plus tard est significative et démontre bien une

Figure 31

Action de FPA (50 µg/ml) ajoutée à divers moments de la période d'éclipse sur le titre du virus, 1 jour et 2 jours après infection *



* La production virale, dans les différents lots contenant FPA, est exprimée en pourcentage par rapport à celle du témoin dépourvu de FPA, après avoir rapporté les titres à un nombre de cellules égal à celui des cultures témoins.

La partie gauche de la figure se rapporte à la production mesurée 1 jour après l'infection.

La partie droite de la figure se rapporte à la production mesurée 2 jours après l'infection; dans un lot, FPA a été ajoutée 24 h. après l'infection.

Tableau 21

Action de FPA (50 µg/ml) sur la croissance des cellules et du virus, en fonction du moment de son addition après l'infection

moment de l'addition de FPA		âge des cultures (en jours) après infection					
		1	2	3	4	6	7
Témoin	Virus % témoin	100	100	100	100	100	100
	log. cell. par boîte	6,06	6,30	6,45	6,55	6,41	6,55
1 h.	Virus % témoin	18	17				
	log. cell. par boîte	5,92	5,92	5,90			
1 j.	Virus % témoin		76	87	70		
	log. cell. par boîte	6,06	6,17	6,19	6,25		
2 j.	Virus % témoin			95	85	70	
	log. cell. par boîte	6,06	6,30	6,47	6,60	6,41	
3 j.	Virus % témoin				45	55	
	log. cell. par boîte	6,06	6,30	6,45	6,45	6,40	

inhibition de la synthèse virale. On peut remarquer que seules, les cultures où FPA a été ajoutée 1 jour après l'infection ont un nombre de cellules légèrement inférieur à celui des cultures témoin sans FPA. Les autres lots ont un nombre de cellules égal à celui des témoins.

2 - DISCUSSION

Comme pour les cellules HeLa (Ackermann et coll. 1954), la FPA

n'a pas d'action toxique sur les cellules de poulet aux faibles doses et à partir de 50 µg/ml, elle n'a qu'un effet cytostatique, même après 3 jours de contact avec les cellules. Le fait que cette action soit surtout marquée quand on l'ajoute 1 jour et 2 jours après le repiquage suggère que la FPA est incorporée à ce moment plus rapidement dans les cellules, ce qui est en accord avec le fait que le métabolisme des cellules de poulet in vitro diminue déjà d'une façon importante dès le 3e jour, par suite du ralentissement de leur vitesse de multiplication (chapitre V).

Pour expliquer les résultats que nous avons obtenus en ce qui concerne la réduction de la production virale, on doit émettre l'hypothèse que deux sortes de réactions différentes (a) et (b) sont sensibles à l'action de la FPA. Le processus (a) se produirait parallèlement à la synthèse de l'ARN dont il aurait les mêmes caractéristiques du point de vue cinétique, et pourrait correspondre à la synthèse de protéines, d'enzymes nécessaires à la synthèse de l'ARN viral (par exemple, une polymérase) ; le processus (b) se produirait tardivement, de quelques heures à quelques jours avant la libération des particules suivant l'intensité de l'activité métabolique de la cellule infectée, et pourrait correspondre aux synthèses des protéines des capsides.

Compte tenu de cette hypothèse et de ce que l'on connaît de la cinétique de la synthèse de l'ARN d'après l'action de FU, on peut expliquer les résultats apparemment contradictoires qui montrent que l'on ne peut inhiber la production virale d'une façon notable que lorsqu'on ajoute FPA durant l'éclipse et 3 jours après l'infection :

- lorsqu'on ajoute FPA à divers moment de la période d'éclipse,

la réduction de la production à 1 jour et 2 jours est d'autant plus marquée que l'inhibiteur a été ajouté plus tôt, et le parallélisme entre la figure 31 et les figures 17-18 où l'on a porté les résultats de l'action de FU, suggère que cette réduction est due en majeure partie à l'inhibition des réactions (a). Cependant, le délai entre la fin de la synthèse de l'ARN par conséquent du processus (a), et la libération des particules correspondantes, étant assez court pour les cellules qui libèrent précocement leurs premières particules (7 h. voir discussion première partie), il est vraisemblable que les deux chaînes de réactions (a) et (b) se superposent, en particulier durant la seconde moitié de la période d'éclipse, et sont inhibées simultanément par FPA. Le fait que la fluoro-phénylalanine ne réduit pas la production au-dessous de 20% de celle du témoin suggère que, comme pour l'ARN, les cellules qui produisent le plus tôt leur virus synthétisent les protéines virales partiellement aux dépens des aminoacides présents au moment de l'infection.

- lorsqu'on ajoute FPA 1 jour et 2 jours après l'infection on voit que la réduction de la production est peu importante ; ceci est en accord avec le fait que les réactions (a), parallèles à la synthèse de l'ARN, n'ont pu être inhibées étant donné qu'elles devaient être achevées en majeure partie au moment de l'addition de l'inhibiteur. Nous venons de voir en effet qu'elles se produisent durant l'éclipse et au plus tard jusqu'à 20 h. après l'infection par analogie avec la cinétique de la synthèse de l'ARN. Dans ces conditions, seul le processus (b) a pu être inhibé. Le faible degré d'inhibition suggère, par ailleurs, que les réactions (b) sont moins sensibles à l'action de FPA aux doses que nous avons employées, que les réactions (a).

- enfin, lorsqu'on ajoute FPA 3 jours après l'infection, on voit que la production est réduite significativement pendant les jours suivants, suggérant que les deux processus (a) et (b) ont dû être inhibés dans les cellules qui ne libèrent leurs premières particules que 4 jours après l'infection (chapitre III). C'est ce qui a du se produire en effet, puisqu'on a vu que l'asynchronisme de la libérationdu virus pendant les premiers jours qui suivent l'infection (4 à 5 jours) est dû aux moments différents auxquels les cellules infectées commencent à synthétiser les précurseurs, notamment l'ARN. Dans ces conditions, FPA a été ajoutée alors que les réactions (a) n'étaient pas complètes, d'où leur inhibition assez importante, coïncidant, dans les phases tardives de la maturation des particules, avec l'inhibition des réactions (b). On voit donc que dans ce système cellule-virus de Rous, et compte tenu de l'hypothèse que nous avons émise pour expliquer les résultats, on ne peut agir sur la synthèse des protéines impliquées dans les réactions (a) que pendant le temps que mettent toutes les cellules à synthétiser l'ARN viral nécessaire à la constitution du matériel génétique des particules produites pendant au moins 10 jours, c'est-à-dire durant les 3 premiers jours qui suivent l'infection, comme l'ont montré les expériences effectuées en présence de FU. Au contraire, les réactions (b) doivent rester sensibles à l'action de FPA, même dans les cellules déjà productrices de virus, comme tendent à le démontrer les réductions de la production observées quand l'inhibiteur a été ajouté 1 jour et 2 jours après l'infection (tableau 21).

Dans l'ensemble, ces résultats et l'interprétation qu'on leur en donne sont en accord avec les travaux de Ackermann et coll. (1954-1955)

sur l'action de FPA sur la synthèse du virus de la poliomyélite dans les cellules HeLa, et avec les travaux de Zimmermann et Schäfer (1960) sur l'action de FPA sur la synthèse du virus de la peste aviaire dans les cellules de poule. L'action de FPA ajoutée durant la période d'éclipse est, pour ces virus comme pour le virus de Rous, d'autant plus marquée que l'inhibiteur est ajouté plus tôt après l'infection, et correspond donc apparemment à des réactions parallèles à la synthèse de l'ARN viral, c'est-à-dire ce que nous avons appelé le processus (a). Zimmermann et Schäfer ont montré que la synthèse de l'hémagglutinine est inhibée par FPA, provoquant ainsi la réduction de la production virale, bien que l'antigène "s" soit synthétisé normalement dans le noyau; de plus, ils ont constaté que le transfert de l'antigène "s" hors du noyau est sensible à l'action de FPA, démontrant donc que cet inhibiteur peut réduire la production virale selon deux processus différents.

D'autre part, ce que nous avons appelé processus (b) semble correspondre aux réactions sensibles à l'action de la proflavine dans les cellules infectées par les virus de la poliomyélite (Ledinko, 1958) de la peste aviaire (Franklin, 1958), de la fièvre aphteuse (Brown et Stewart, 1960), de l'EMC (Sanders, 1960); ce dérivé réduit la production virale en inhibant le rassemblement des sous-unités infectieuses ou en supprimant la libération du virus mur déjà présent dans le cytoplasme (poliomyélite, Ledinko, 1958).

Pour terminer, on peut signaler qu'on a observé la conversion morphologique des cellules infectées + FPA comme dans les témoins sans FPA, même dans les lots où la production virale était réduite de 5 fois

par rapport à celle du témoin; ceci suggère que la conversion morphologique ne dépend pas d'une des chaînes de synthèse protéique que nous venons d'évoquer, et constitue un point commun avec le fait que des virus comme ceux de la poliomyélite (Ackermann et coll. 1954), de la fièvre aphteuse (Brown et Stewart 1960) ont une action cytopathogène même lorsque la production des particules infectieuses est inhibée par la fluorophénylalanine ou la proflavine.

CHAPITRE V

MODIFICATIONS QUANTITATIVES DES ACIDES NUCLEIQUES ET DES PROTEINES PROVOQUEES DANS LES CELLULES PAR LE VIRUS DE ROUS

(Goldé, 1962)

I - INTRODUCTION

Les effets du développement d'un virus animal sur le métabolisme de la cellule qu'il infecte ont été étudiés dans un certain nombre de systèmes. Dans l'ensemble, les résultats des dosages des acides nucléiques et des protéines sont en accord avec ce que les observations cytochimiques permettaient de prévoir. On peut distinguer deux groupes de travaux suivant la nature de l'acide nucléique du virus étudié . Dans le premier groupe, qui comprend les virus à ADN, l'augmentation des quantités d'ADN et de protéines dans les cellules infectées coïncide soit avec la présence d'un matériel feulgen + dans le cytoplasme (vaccine, Magee et Sagik 1959), soit avec des modifications de l'aspect des noyaux (herpès, Newton et Stoker 1958 -pseudo rage, Ginsberg et Dixon 1961) ou de leur nombre (adénovirus, Kaplan et Ben Porat 1959).

Dans le second groupe qui comprend les virus à ARN, les expériences ont porté essentiellement sur les modifications chimiques provoquées dans les cellules de mammifères in vitro par le développement du virus de la poliomyélite. Les résultats sont assez contradictoires ; Maassab et coll. (1957), Ackermann (1958), Ackermann et coll. (1959) rapportent des augmentations de l'ARN et des protéines, ce qui est en accord avec les observations cytochimiques qui montrent l'augmentation de la basophilie cytoplasmique dans les cellules infectées, tandis que Salzman et coll. (1959), Rothstein et Manson (1959) constatent, au contraire, que la synthèse des acides nucléiques et des protéines cesse dès l'infection. Il est possible que ces résultats divergents proviennent de conditions expérimentales différentes; en effet, les premiers auteurs cités ont effectué leurs expériences sur des cultures à l'état stationnaire, alors que les seconds ont utilisé des cellules en phase de croissance logarithmique.

En ce qui concerne le virus de Rous, les observations cytochimiques (chapitre II) qui montrent une augmentation importante de la basophilie sont en accord avec le fait que son matériel génétique est un ARN, comme on l'a démontré dans le chapitre précédent et comme l'analyse chimique des particules purifiées l'a prouvé (Crawford et Crawford 1961). La basophilie cytoplasmique et les modifications importantes de l'aspect des cellules infectées (chapitre II) suggèrent qu'elles sont le siège de changements métaboliques profonds. C'est pourquoi nous avons effectué les expériences décrites dans ce chapitre, au cours desquelles on a dosé l'ADN, l'ARN, les nucléotides acido-solubles et les protéines présents

dans les cellules infectées à différents moment du cycle de multiplication du virus. L'étude parallèle des cellules non infectées nous a permis, de plus, de préciser l'influence que peuvent avoir les conditions de culture sur le métabolisme cellulaire.

II - MATERIEL ET METHODES

1) Conditions de cultures

Les conditions de cultures sont les mêmes que celles qui ont été décrites précédemment : trois jours après la mise en culture des cellules embryonnaires, les cellules ont été repiquées à la concentration de 5.10^5 cellules par ml de milieu nutritif. Etant donné le nombre élevé de cellules qu'il faut extraire pour effectuer chaque dosage, les cultures secondaires ont été faites dans de grands flacons de Roux bouchés hermétiquement avec des bouchons de caoutchouc, contenant 60 ml de milieu 721. Les milieux ont été renouvelés complètement tous les 2 jours.

2) Conditions d'infection et titrages

Ce sont les conditions standard : on a infecté les cellules 24 heures après le repiquage avec un volume de suspension virale de 0,01 ml par centimètre carré, soit 4 ml par flacon. Après 1 heure d'adsorption l'inoculum viral a été éliminé, et les cellules ont été lavées pendant 4 heures avec 40 ml de milieu 721 afin d'éluer les particules adsorbées sur les membranes cellulaires. Les multiplicités d'infection étaient toutes comprises entre 0,1 et 1 UP/cellule, ce qui est suffisant pour

infecter toutes les cellules.

Le virus libre dans le milieu et les centres infectieux ont été titrés selon la méthode standard décrite dans le chapitre I.

3) Méthode d'extraction et dosages chimiques

Les dosages ont été effectués sur les extraits de 2.10^7 cellules au minimum, contenues dans 2 à 4 flacons suivant l'âge des cultures.

Les cellules témoins non infectées ont été extraites avant la mise en culture (cellules de l'embryon), puis 3 jours au plus tard au moment du repiquage, et tous les jours jusqu'au 8e jour après repiquage.

Les cellules infectées ont été extraites 4 heures, puis tous les jours après infection pendant une semaine. On a titré le virus et les centres infectieux à chaque prélèvement.

Les cultures infectées et non infectées effectuées à partir de cellules primaires issues du même embryon, ont été traitées de la façon suivante ;

- après avoir éliminé tout le milieu nutritif, on a incubé les cellules durant 4 heures à 37° avec 40 ml de M "199", on les a ensuite lavées rapidement avec du PBS⁻, et on les a détachées du verre en faisant agir une solution de trypsine à 0,05% dans du PBS pendant 15 minutes à 37°; la suspension cellulaire a été alors centrifugée à 1.000 tm/5 min. et le culot a été repris dans un volume connu de PBS. On a compté les cellules à l'hématimètre et mesuré leur volume en les centrifugeant en totalité dans un tube hématocrite gradué en 1/150 de ml, à 4.000 tm./15 min.

Toutes les extractions ont été effectuées sur des cellules délipidées au préalable de la manière suivante : après avoir mesuré leur volume

les cellules ont été mises en suspension successivement durant plusieurs heures, dans de l'alcool absolu distillé, de l'alcool éther (2/1) et de l'éther pur; on a laissé se déssécher spontanément à l'air le culot de la dernière centrifugation. La poudre cellulaire obtenue a été à ce moment extraite avec de l'acide perchlorique (ClO^4H) d'après une technique similaire à celle décrite par Salzman et coll. (1959).

Les nucléotides acido-solubles ont été extraits en laissant les cellules délipidées au contact de 4 à 5 ml de ClO^4H à 5%, pendant une nuit à 4°C. Après avoir centrifugé la suspension à 5.000 tm. pendant 10 minutes, on a prélevé le liquide surnageant, contient la totalité des nucléotides cellulaires, et on y a dosé le ribose par la méthode colorimétrique de Cériotti (1956); les résultats des nucléotides sont exprimés en μg d'ARN correspondant au ribose dosé (teneur en ribose x 3,76).

Le sédiment insoluble a été ensuite hydrolysé 2 fois de suite avec 4 à 5 ml de ClO^4H à 5%, au bain-marie à 90°C pendant 15 minutes, on obtient ainsi la dissolution des acides nucléiques, ARN et ADN; le ribose de l'ARN a été dosé comme on l'a dit précédemment pour les nucléotides, tandis que le désoxyribose de l'ADN a été dosé par la méthode de Burton (1956).

Le culot insoluble contient les protéines totales ; on les a dissoutes après agitation énergique dans de la soude normale au bain-marie à 37° pendant une nuit, et on les a dosées par la méthode de Lowry et coll. (1951).

Les solutions standard étaient une solution de ribose pour l'ARN une solution d'ADN purifié de thymus de veau pour l'ADN, et une solution

d'albumine de boeuf cristallisée pour les protéines.

L'erreur limite supérieure a été calculée d'après les résultats des dosages de 7 cultures primaires différentes âgées de 3 jours. Cette erreur maximum, probablement très supérieure à celle que l'on aurait trouvée si on avait calculé l'erreur standard sur la moyenne des résultats d'échantillons issus des mêmes cultures, est de 15% pour les nucléotides, 25% pour l'ADN et les protéines, et 30% pour l'ARN; on doit noter que les lavages des cellules avant l'extraction provoquent une certaine perte de protéines (Puck et coll. 1956 ; Salzman 1959) que nous n'avons pas mesurée ; cependant elle ne doit pas être très importante étant donné qu'elle ne dépasse pas 15% dans des cellules rendues fragiles par l'infection avec un virus cyto-destructeur (pseudo-rage, Kaplan et Ben Porat 1959).

III - RESULTATS

I. Cellules non infectées

Le tableau 22 montre les modifications observées dans les cellules non infectées à partir de la mise en culture jusqu'à 8 jours après repiquage.

1) Cultures primaires

On voit que la mise en culture des cellules d'embryon de poulet en couche monocellulaire provoque, pendant les 3 premiers jours de la multiplication, une augmentation de 100% du volume cellulaire moyen et des quantités d'ARN, de nucléotides et de protéines.

2) Cultures secondaires

On observe, après le repiquage, trois périodes de multiplication et d'activité métabolique (tableau 22) :

Tableau 22

Volumes cellulaires moyens, acides nucléiques et protéines dans les cellules non infectées, en fonction de temps de culture (a)

Jours	Volumes	ADN	ARN	Nucleotides[b]	RNA + nucleotides[b]	Protéines
0 (embryon)	0.70	1.3	1.55	4.45	6.0	17
3 (repiquage)	1.65	1.5	3.5	9.5	13.0	36
1 (c)	2.0	2.6	7.5	11.5	19.0	57
2	2.25	3.0	2.9	16.5	19.5	67
3	2.95	2.5	2.6	14.5	17.1	72
4	2.55	1.6	4.9	13.0	17.9	70
5	2.5	ND[d]	ND	12.0	ND	94
8	3.4	2.0	6.4	12.0	18.5	95

(a) Résultats des expériences I et II ; mm3 en µg pour 10^6 cellules.

(b) Les nucléotides sont exprimés en équivalents d'ARN, c'est-à-dire en quantités d'ARN qui auraient la même teneur en ribose (ribose des nucléides x 3.76)

(c) Ages des cultures, en jours, à partir du repiquage.

(d) ND = non dosé

- la période de latence (A)

Pendant le premier jour qui suit le repiquage, les cellules se fixent et s'étalent sur le verre; bien qu'elles ne se multiplient pas encore leur activité métabolique est importante : l'ADN double (figure 32), alors que les quantités d'ARN, de nucléotides acido-solubles et de protéines augmentent de 1,5 fois (figure 33 et 34).

- la période de multiplication cellulaire (B)

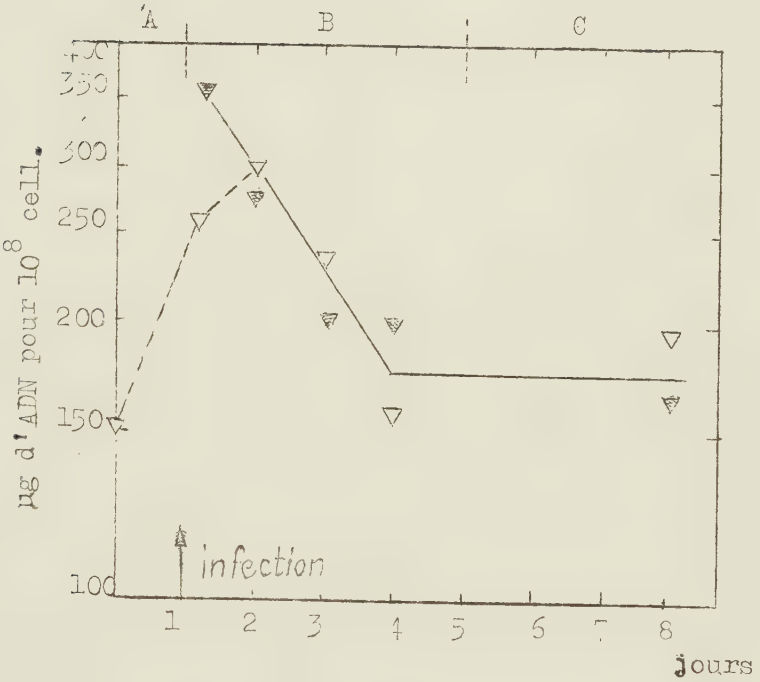
Les cellules se multiplient du 2e au 4e ou 5e jour après le repiquage, c'est-à-dire jusqu'à ce qu'elles confluent et cessent de se multiplier, comme on l'a vu dans le chapitre III. Le temps moyen de doublement dans les expériences I et II citées comme exemples au cours de ce chapitre était de 13, 30, 45 et 90 heures à 2, 3, 4 et 5 jours respectivement. On voit, dans la figure 35, que le volume cellulaire moyen n'augmente que peu pendant cette période; par conséquent, l'accroissement du volume total de la population cellulaire est parallèle à l'augmentation du nombre des cellules par culture. On verra plus loin qu'il n'en est pas de même pour les cultures infectées.

La figure 32 montre que l'excès d'ADN accumulé durant la période de latence disparaît au cours de la multiplication des cellules. En effet, à partir du 3e ou du 4e jour, le quantité d'ADN par cellule est égale à celle trouvée au moment du repiquage, c'est-à-dire 1,5 à 2 x 10^{-6} μg/cellule.

La quantité d'ARN cellulaire diminue beaucoup durant le premier jour de la période de multiplication, puis augmente de façon peu importante jusqu'à 4 jours.

Figure 32

Quantités d'ADN, en µg, pour 10^8 cellules infectées et non infectées en fonction du temps après repiquage (expériences I et II)



Chaque dosage a été effectué à partir de l'extrait de 2.10^7 cellules délipidées. Le desoxyribose a été dosé d'après la méthode de Burton.

▽ = cellules non infectées

▼ = cellules infectées dans les conditions standard, 24 heures après repiquage (flèche), à une multiplicité suffisante pour infecter toutes les cellules.

A, B, C représentent les différentes périodes de la croissance des cellules non infectées.

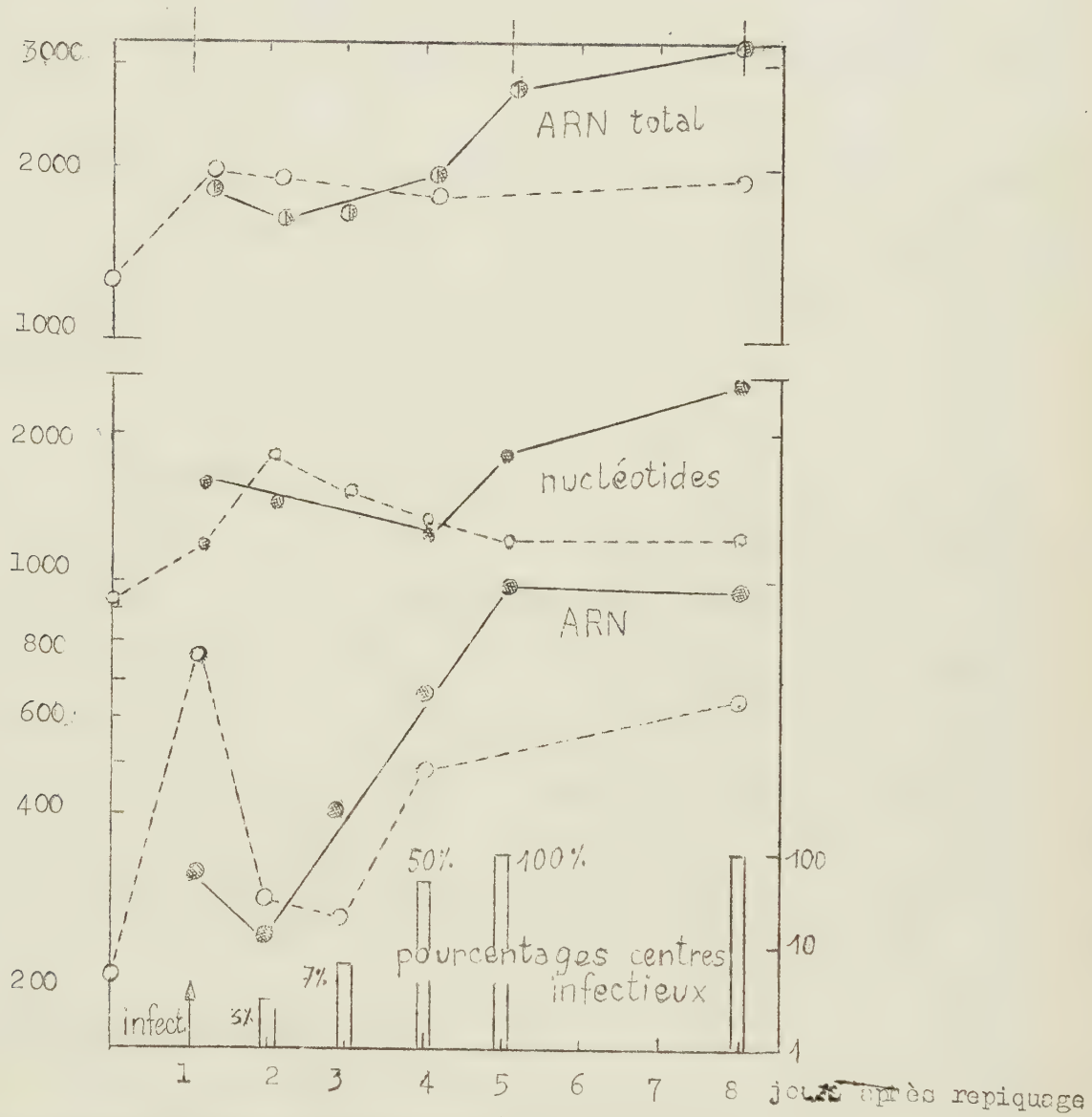
A = période de latence, durant laquelle les cellules ne se multiplient pas encore.

B = période de croissance

C = période stationnaire, correspondant à la confluence cellulaire.

Figure 33

Quantités d'ARN total (ARN + nucléotides), d'ARN, de nucléotides acido-solubles en µg pour 10^8 cellules infectées et non infectées, en fonction du temps de repiquage *



* Une partie des cultures a été infectée dans les conditions standard 24 heures après repiquage (flèche). Les centres infectieux ont été titrés après un lavage préalable des cellules pendant 4 h. afin d'éliminer la majorité du virus adsorbé sur les membranes cellulaires.

Les droites en traits discontinus représentent les cellules témoins non infectées; les droites en traits pleins représentent les cellules infectées.

Comme dans la figure 32 , A, B, C correspondent aux différentes périodes de la croissance des cellules non infectées.

Chaque dosage a été effectué à partir de l'extrait d'au moins 2.10^7 cellules. Le ribose de l'ARN et des nucléotides a été dosé par la méthode de Ceriotti. Les nucléotides sont exprimés en quantité d'ARN correspondante (ribose des nucléotides x 3,76).

La quantité de nucléotides acido-solubles augmente du premier au second jour après le repiquage, c'est-à-dire au moment où les cellules se multiplient activement. On observe ensuite une diminution régulière, peu importante, jusqu'au 5e jour.

On peut remarquer que l'ARN total (ARN + nucléotides acido-solubles) est pratiquement constant durant toute la période de multiplication.

Les protéines augmentent peu et évoluent parallèlement au volume cellulaire moyen (figure 34).

- la période stationnaire (C)

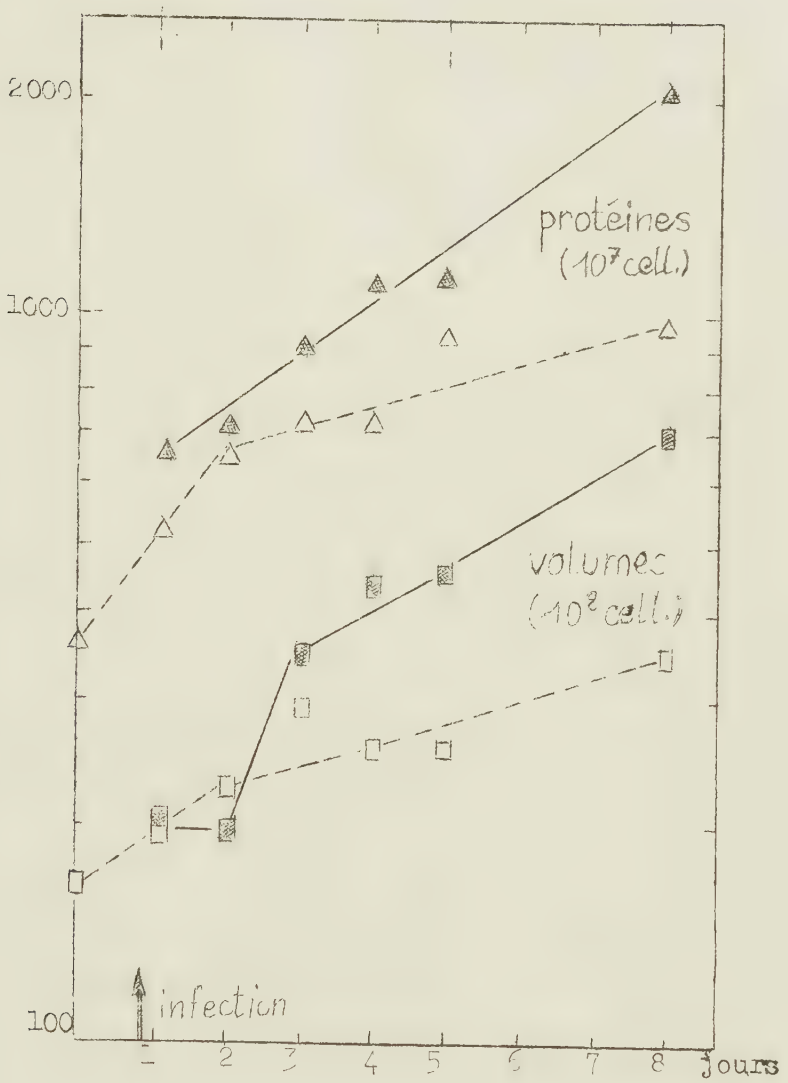
A partir du 5e jour après le repiquage, les cellules sont confluentes et ne se multiplient pratiquement plus. Dans ces cultures stationnaires, l'ADN, l'ARN, les nucléotides acido-solubles restent au niveau atteint à la fin de la période précédente. Seuls la teneur en protéines et le volume cellulaire moyen continuent à augmenter lentement (figure 34). Ceci explique pourquoi, bien que la multiplication soit arrêtée, le volume total des cellules d'une culture continue à augmenter (figure 35).

II - Cellules infectées

Dans l'ensemble, les modifications du volume cellulaire total et des quantités respectives des différents métabolites dosés dépendent de la multiplication du virus et des centres infectieux. La figure 36 montre la multiplication totale des cellules, ainsi que celle des centres infectieux et du virus libre par flacon dans les expériences I et II. Comme on l'a vu dans le chapitre III, le nombre des cellules productrices de virus

Figure 34

Volume (mm3 pour 10^8 cellules) et quantités de protéines (en µg pour 10^7 cellules) dans les cellules infectées et non infectées, en fonction du temps après repiquage (Expériences I et II)



Les droites en traits pleins représentent les cellules infectées 24 h. après repiquage (flèche) ; les droites en traits discontinus représentent les cellules non infectées.

A, B, C correspondent aux différentes périodes de la croissance des cellules non infectées.

Les volumes ont été mesurés en centrifugeant la totalité des cellules (2.10^7) de chaque culture dans un tube hématocrite gradué en 1/150 cm3, à 4.000 tm/15 min.

Les protéines ont été dosées d'après la méthode de Lowry et coll. après dissolution du culot cellulaire dans de la soude normale à 37°.

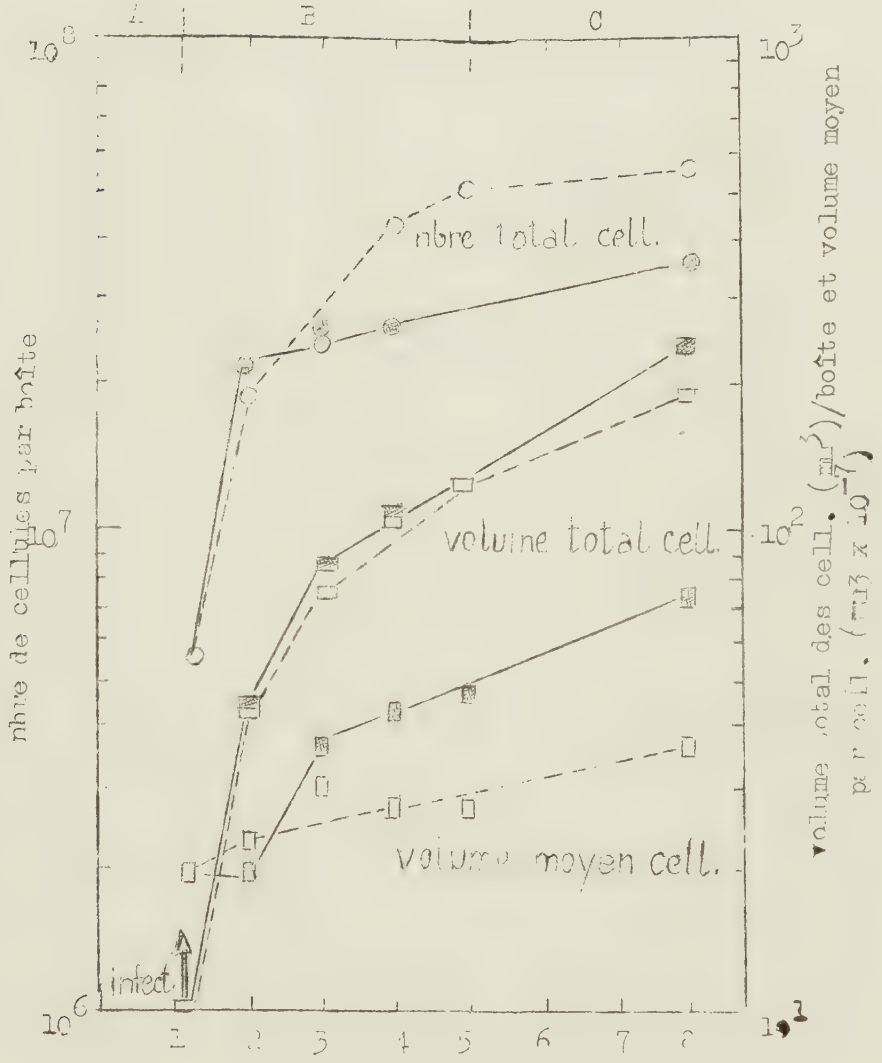
augmente beaucoup plus rapidement que celui des cellules totales et atteint le maximum 4 jours après l'infection; il est de 100% dans ces expériences, c'est-à-dire que toutes les cellules infectées au cours de l'infection initiale libèrent du virus. La production moyenne, calculée d'après la formule de Rubin (1957) est de 13 UP par cellule et par jour au moment de la période d'équilibre du cycle de multiplication du virus.

a) Multiplication et volume cellulaires

On voit dans la figure 35 que les cellules infectées se multiplient à la même vitesse que les cellules non infectées pendant le premier jour qui suit l'infection. A partir du 2e jour, leur vitesse de multiplication diminue beaucoup, et la durée moyenne d'une génération est de 90 h. au lieu de 45 h. dans le témoin. Ce ralentissement, bien que très marqué dans ces expériences, est un phénomène que l'on a observé assez généralement(voir chapitre III). Par conséquent, le nombre des cellules dans les cultures infectées était toujours inférieur à celui des cultures témoins. Par ailleurs, la figure 35 montre que la réduction de la vitesse de multiplication des cellules infectées coïncide avec une augmentation importante du volume cellulaire moyen, notable dès le 2e jour qui suit l'infection, et qui se poursuit régulièrement jusqu'au 7e jour; il est, à ce moment double de celui des cellules non infectées. Cependant, on voit que le volume total des cellules non infectées et infectées, étant donné que dans ces dernières le plus faible nombre de cellules est compensé par l'accroissement du volume individuel (figure 35).

Figure 35

Croissance cellulaire, évolution du volume total (1) et du volume moyen (2) des cellules infectées et non infectées en fonction du temps après repiquage (Exp. I et II)



Les droites en traits discontinus représentent les cultures non infectées; les droites en traits pleins représentent les cultures infectées 24 h. après repiquage (flèche).

Au moment du repiquage, les cultures ont été ensemencées à raison de 5.10^5 cellules par ml.

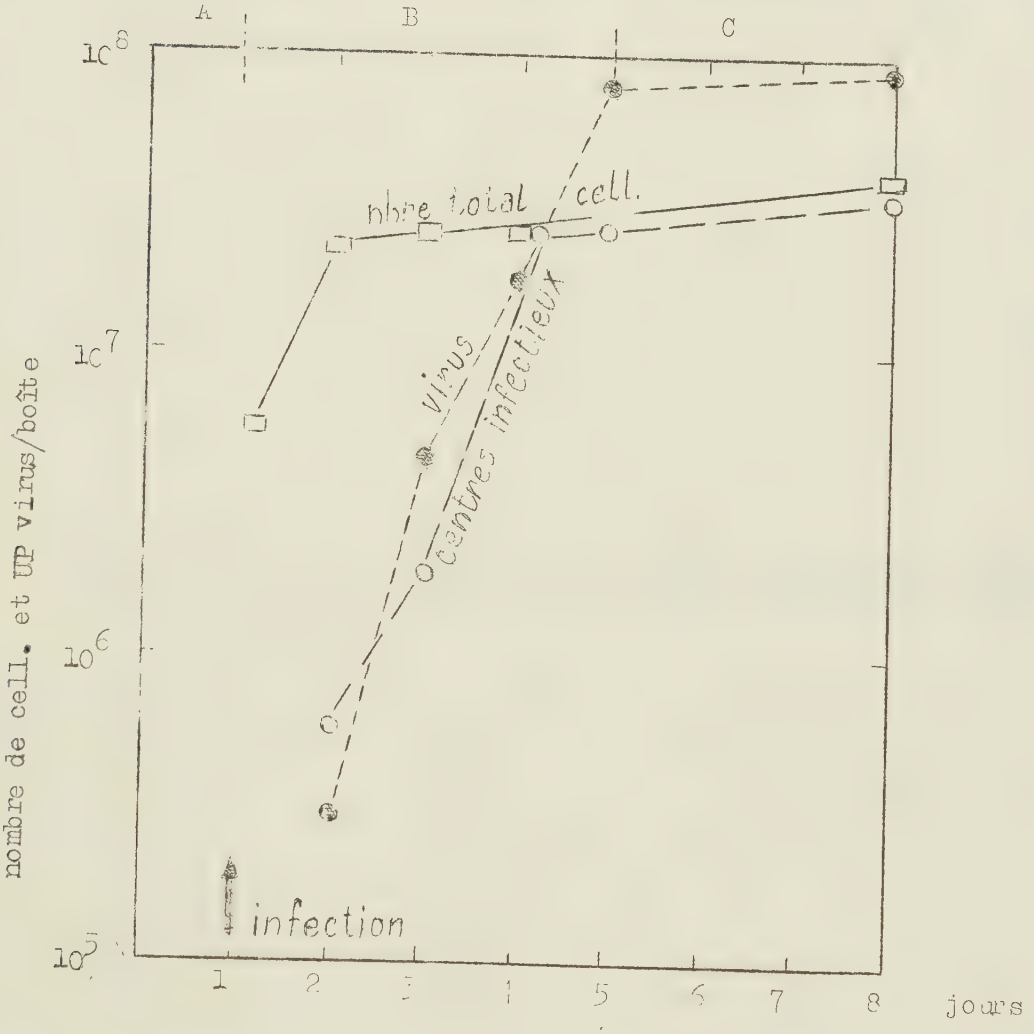
(1) Le volume total des cellules (en mm3) de chaque culture a été mesuré comme on l'a indiqué dans la figure 34.

(2) Le volume cellulaire moyen, exprimé en mm3 x 10^{-7}, a été obtenu en divisant le volume total par le nombre des cellules à chaque culture. Volume total et volume moyen sont portés sur l'échelle à droite de la figure.

A, B, C correspondent aux périodes de la croissance des cellules non infectées.

Figure 36

Croissance de la population cellulaire totale, des centres infectieux et du virus par culture (Exp. I et II)



L'infection a été effectuée 24 h. après repiquage à une multiplicité suffisante pour infecter toutes les cellules. Les titres du virus libre et le nombre des centres infectieux sont exprimés en log. du nombre d'unités pocks par culture.

b) Modifications chimiques

Les dosages ont été effectués 4 h. après infection, puis tous les jours jusqu'à 7 jours.

ADN : les variations des quantités d'ADN sont identiques à celles observées dans les cultures témoins (figure 32). La plus haute valeur trouvée à 4 h. ne semble pas être significative.

ARN : la figure 33 et le tableau 23 montrent qu'il y a une perte d'ARN de 55% par rapport à la teneur en ARN, du témoin, 4 heures après l'infection. Cependant, cette perte n'est que transitoire et dès le second jour qui suit l'infection on trouve au contraire un excès d'ARN qui repré-

Tableau 23

Excès d'ARN, de nucléotides, d'ARN total, de protéines, augmentation des volumes cellulaires, exprimés en pourcentages de leur valeur respective dans les cellules non infectées (a).

Temps après infection (jours)	ARN	Nucléotides	ARN total	Protéines	Volume cell. moyen	Centres infectieux (c)
(4 h.)	(-56)	30	(- 4)	0	0	-
1	0	(-17)	(-17)	0	0	3
2	68	ND	ND	25	14	7
3	38	4	7,5	60	69	50
4	ND[b]	41	ND	ND	80	100
7	53	85	74	110	100	100

(a) Les différences entre les résultats des dosages et de la mesure des volumes des cellules infectées et des cellules non infectées du même âge sont exprimées en pourcentages des valeurs normales des cellules témoins.

(b) ND = non dosé.

(c) = pourcentages des centres infectieux par rapport au nombre total de cellules par flacon.

sente près de 70% de la quantité présente dans les cellules témoins. Un excès de 40 à 50% est ensuite présent dans les cellules infectées jusqu'à la fin de l'expérience . Dans une autre expérience (Exp. III) où le nombre des centres infectieux n'a atteint que 30% du nombre total des cellules au lieu de 100%, l'excès d'ARN 5 jours après l'infection n'était que de 30% des quantités présentes dans les témoins.

Nucléotides acido-solubles : comme le montrent la figure 33 et le tableau 23, les nucléotides augmentent 4 heures après l'infection et l'excès représente 30% de la quantité présente dans les cellules infectées. Cette augmentation ne se poursuit pas et l'on voit que les quantités de nucléotides présentes dans les cellules infectées sont les mêmes que celles des témoins pendant les 3 premiers jours qui suivent l'infection. A partir du 4e jour, ils augmentent d'une façon appréciable, et l'excès atteint à 7 jours représente 85% de la quantité contenue dans les cellules témoins du même âge. On peut voir aussi que la quantité d'ARN total, c'est-à-dire ARN + nucléotides, des cellules infectées reste constante et égale à celle des cellules non infectées de 4 h. à 3 jours après l'infection. Elle augmente ensuite du 4e jour au 7e jour, où l'excès atteint représente 75% de la teneur normale des cellules témoins.

Les protéines augmentent à partir du 2e jour après l'infection, jusqu'à la fin de l'expérience. On voit, dans la figure 34 et le tableau 23, que cette augmentation est parallèle à celle du volume cellulaire moyen. Ainsi, 7 jours après l'infection, la quantité de protéines par cellule est le double de celle des cellules témoins; dans l'expérience III mentionnée précédemment, l'augmentation des protéines et du volume moyen n'a atteint

que 60% des valeurs du témoin.

DISCUSSION

Nous allons d'abord discuter des résultats rapportés lors de l'étude des cellules non infectées, avant d'aborder la discussion des résultats obtenus en dosant les cellules à divers moment de la multiplication du virus.

1) Cellules normales non infectées

Dans l'ensemble, nos observations sont en accord avec celles qui ont été faites au cours de l'étude de souches établies de cellules normales ou cancéreuses. Les trois périodes de la multiplication cellulaire observées dans les cultures de fibroblastes d'embryon de poule ont été également décrites dans les cultures de cellules HeLa (Puck et coll. 1956, Salzman 1959) ou L (Hill et coll. 1959). La période de latence, d'environ 24 h. quand le repiquage a été fait à partir de cultures primaires stationnaires, et la durée moyenne d'une génération dans les premiers jours de la multiplication des cellules de poulet, sont comparables à celles des souches établies depuis plusieurs années, par exemple les cellules HeLa qui doublent en nombre en 18 - 22 heures, et les cellules L en 28 heures (Siminovitch et coll. 1957). Cependant, la multiplication des cellules de poulet se ralentit plus tôt après le repiquage que celle des souches citées ci-dessus. On a vu que la confluence est responsable de ce ralentissement et de l'arrêt total de la multiplication durant la période stationnaire. L'augmentation de 5 fois du volume cellulaire moyen depuis la mise en culture jusqu'à la fin

de l'expérience (tableau 22) suggère que les facteurs limitant le volume des cellules in vivo n'agissent plus sur les cellules in vitro. Le volume moyen d'une cellule de poulet après 8 jours de culture est égal à celui des cellules HeLa (Puck et coll. 1956).

La correspondance observée entre les modifications chimiques et les périodes de la multiplication dans les cultures secondaires a été aussi notée pour les souches établies. Ainsi, l'augmentation des quantités d'acides nucléiques et de protéines pendant la période de latence démontre que les cellules ont à ce moment un métabolisme intense; en particulier, le doublement de la quantité d'ADN s'observe généralement dans les cellules repiquées à partir de cultures stationnaires (Salzman 1959; Hill et coll. 1959 ; Whitfield et Rixon 1960) et est dû à la duplication du matériel chromosomique précédant la division cellulaire.

Comme on l'a vu dans le tableau 22, dès que les cellules commencent à se multiplier, la quantité d'ARN décroît tandis que celle des nucléotides croît, la somme des deux restant constante ; ceci suggère que durant la période précoce de la multiplication, les cellules utilisent d'abord les réserves accumulées durant la période de latence. Ce phénomène a été noté dans les cellules HeLa par Salzman (1959) et Salzman et Sebring (1959). Cependant, dans les cellules de poulet l'ARN total reste ensuite constant durant 5 jours , alors qu'il continue à décroître dans les cellules HeLa.

Ces différentes observations permettent d'expliquer certaines caractéristiques des conditions d'infection des fibroblastes par le virus de Rous :

On a dit, dans le chapitre III, qu'un nombre maximum de centres infectieux est détecté 1 jour après l'infection, à condition d'infecter des

cellules repiquées depuis 12 à 24 heures. Or, on vient de voir que cette période correspond à celle durant laquelle les cellules accumulent l'ARN, les nucléotides acido-solubles, les protéines, qui peuvent ainsi être immédiatement utilisés pour la synthèse des précurseurs viraux. En particulier, la diminution importante de la quantité d'ARN dans les cellules 4 heures après infection, et l'augmentation parallèle des nucléotides acido-solubles (figure 33 et tableau 23) peut correspondre à la constitution d'un "pool" de nucléotides à partir duquel les premières molécules d'ARN viral pourront être synthétisées. Ceci semble d'ailleurs confirmé par le fait que l'addition de FU 24 heures avant l'infection provoque une réduction maximum du titre du virus libéré 1 jour et 2 jours après l'infection (chapitre précédent), suggérant que les premières particules infectieuses n'ont pû être formées par suite de l'utilisation de précurseurs cellulaires anormaux ayant incorporé le fluoro-uracile. De même, les protéines accumulées durant la période de latence peuvent être utilisées après dégradation, pour la synthèse précoce des protéines virales. De tels mécanismes de synthèse du matériel viral à partir de l'ARN, des nucléotides et des amino-acides présents dans les cellules au moment de l'infection ont été observés dans les cellules HeLa infectées par le virus de la poliomyélite (Eagle et Habel 1956 ; Darnell et Levintow 1960; Diamond et Balis, 1961). Si ceci est vrai dans le cas du virus de Rous, tout ce qui empêche l'accumulation des métabolites normaux durant la période précédant l'infection doit avoir, comme effet majeur, de différer la libération des particules infectieuses jusqu'à ce que tous les précurseurs aient été synthétisés à partir des éléments du milieu nutritif ; c'est bien ce qui semble se produire quand on garde les cultures à basse

température, ou dans un milieu pauvre en éléments nutritifs (Temin et Rubin 1958, Goldé et Vigier, exp. non publiées). D'autre part, le fait, noté par Rubin (1960), que l'on détecte très peu de centres infectieux 24 heures après l'infection quand on infecte des cellules âgées de quelques jours s'explique par la disparition des réserves cellulaires ; la cellule infectée doit donc synthétiser entièrement les précurseurs viraux à partir des éléments extérieurs et ne libère le virus qu'après un temps supérieur à 1 jour.

2) Cellules infectées

Les modifications chimiques observées dans les cellules infectées par le virus de Rous sont comparables à celles observées dans d'autres systèmes cellule-virus, c'est-à-dire que la multiplication du virus modifie la synthèse de l'acide nucléique de même nature que celui qui porte l'information génétique du virus étudié. Nos résultats se rapprochent plus particulièrement de ceux de Maassab et coll. (1957) Ackermann (1958), Ackermann et coll. (1959) qui ont étudié les cellules HeLa infectées par le virus de la poliomyélite ; dans les deux cas, l'infection virale détermine une augmentation de l'ARN et des protéines cellulaires. Pour le virus de Rous, cependant, les modifications se développent plus lentement étant donné que le maximum de la production virale n'est atteint qu'après plusieurs jours, alors que le rendement maximum du virus de la poliomyélite est atteint en quelques heures. Le fait que les quantités d'ARN et de nucléotides augmentent dès l'infection est en accord avec l'accroissement précoce de la basophilie cytoplasmique (chapitre II).

Considérons successivement les différents résultats obtenus :

a) ARN total (ARN + nucléotides acido-solubles) :

Si l'on examine les variations de l'ARN total en fonction du temps après l'infection, on peut distinguer deux périodes. Au cours de la première, qui dure environ 3 jours, l'ARN total des cellules infectées reste constant et en quantité égale à celle des cellules non infectées (figure 33). Le fait que pendant cette période, le nombre des centres infectieux et le titre du virus augmentent rapidement (figure 36) suggère que la cellule utilise son ARN après l'avoir dégradé pour synthétiser les précurseurs viraux, comme Diamond et Balis l'ont démontré dans les cellules HeLa infectées par le virus de la poliomyélite (1961), et confirmant ainsi l'hypothèse émise dans le paragraphe précédent. Ceci peut expliquer aussi le ralentissement de la multiplication des cellules infectées, étant donné que les métabolites doivent servir à la fois pour synthétiser le matériel nécessaire à l'édification des cellules filles et pour synthétiser les particules virales.

La seconde période coïncide avec le plateau de la production virale atteint 4 jours après l'infection, quand le nombre des centres infectieux est maximum et que la multiplication des cellules est arrêtée. Durant cette période, l'ARN total, et en particulier les nucléotides acido-solubles, augmentent progressivement; ceci suggère que la régulation de la synthèse de l'ARN dans les cellules infectées est perturbée, sinon supprimée.

b) Nucléotides acido-solubles

La première augmentation des nucléotides observée 4 heures après infection semble résulter d'une dépolymérisation de l'ARN présent dans les cellules au moment de l'infection (figure 33, tableau 23). Il est possible

que ceci soit dû à l'augmentation de l'activité de la ribonucléase cellulaire, comme l'ont suggéré Salzman et coll. (1959) qui ont observé le même phénomène dans les cellules HeLa infectées par le virus de la poliomyélite. Après cette augmentation initiale, la teneur en nucléotides diminue d'une façon peu significative jusqu'à 3 jours après l'infection. La seconde augmentation importante des nucléotides dans les cellules infectées se produit à partir du 4e jour et s'accentue jusqu'à la fin de l'expérience, c'est-à-dire pendant la période où toutes les cellules infectées produisent le maximum de particules infectieuses. Il est possible que cette accumulation de nucléotides corresponde à l'établissement de réserves à partir desquelles l'ARN viral peut être synthétisé; elle peut aussi provenir d'une utilisation réduite des métabolites par suite de l'arrêt de la multiplication des cellules; enfin, les deux phénomènes peuvent se produire simultanément. Comme pour l'ARN, le fait que la cellule continue à synthétiser les nucléotides en excès suggère que les mécanismes de régulation sont perturbés dans les cellules infectées.

c) ARN et protéines

On a vu qu'après la diminution survenue 4 heures après infection, l'ARN augmente à partir du 2e jour qui suit l'infection, et l'excès représente en moyenne 50 à 70% de la quantité présente dans les cellules non infectées, jusqu'à la fin de l'expérience. Cette augmentation peut provenir soit de la synthèse d'un ARN cellulaire normal ou anormal, comme l'ont observé Ackermann et coll. (1959) dans les cellules HeLa infectées par le virus de la poliomyélite, soit de la synthèse d'un ARN viral, soit des deux. Si l'on admet que tout l'excès d'ARN est viral, on peut calculer

quelle production de virus il permettrait en se basant sur les résultats de Crawford et Crawford (1961). Ces auteurs ont montré que $1,2.10^9$ UFF (Unités formatrices de foyers) de virus purifié contiennent 21 μg d'ARN ; or dans les expériences I et II, la production journalière par cellule, compte tenu de l'inactivation thermique (formule de Rubin) est de 13 UP; étant donné que 1 UFF = 1 UP (Temin et Rubin 1958, Goldé et Vigier 1961), on peut dire qu'au moment où le palier d'équilibre de la production est atteint 10^8 cellules produisent 13.10^8 ou $1,3.10^9$ UP de virus; d'après les résultats de Crawford, ceci correspond à 21 μg d'ARN. Si l'on considère la quantité d'ARN présente dans 10^8 cellules infectées 7 jours après infection (980 μg) et la quantité contenue dans les cellules témoins du même âge (640 μg), on voit que l'excès d'ARN est de 340 μg, ce qui représente 16 fois plus d'ARN qu'il n'en est nécessaire pour assurer la production virale journalière. Nous avons signalé au cours de la discussion du précédent chapitre (p. 167), que ceci pourrait expliquer le fait qu'on ne peut plus réduire la production du virus par le FU au-delà de 3 jours après l'infection.

Une telle différence entre l'excès de l'acide nucléique cellulaire du même type que celui du virus et la quantité d'acide nucléique nécessaire à la constitution des particules produites par les cellules infectées a été observée dans les cellules infectées par le virus de la poliomyélite (Ackermann et coll. 1959), le virus de l'herpès (Newton et Stoker 1958) et les adenovirus (Ginsberg et Dixon 1961 ; Green et Daesch 1961). Dans les cellules de Rous, il est possible également qu'une partie de l'ARN supplémentaire soit un ARN viral non incorporé dans les particules, comme il semble que ce soit le cas dans les cellules d'ascite de souris infectées par le virus de l'EMC (Sanders 1960). Si cette hypothèse est correcte, la proportion entre

ARN non incorporé et incorporé dans les particules doit être relativement constante étant donné que l'excès d'ARN et la production virale sont constants à partir de la période d'équilibre du cycle de multiplication du virus.

D'autre part, une partie de cet ARN peut intervenir dans la synthèse des protéines qui, nous l'avons vu, augmentent dès le 2e jour qui suit l'infection. Ackermann et coll. (1959) ont également constaté que la multiplication du virus de la poliomyélite dans les cellules HeLa provoque l'augmentation des protéines cellulaires. Cependant, dans les cellules de Rous, les protéines augmentent jusqu'à la fin de l'expérience, tandis que l'ARN est constant à partir du 2e jour, ce qui entraîne une augmentation du rapport protéines/ARN suggérant un processus d'accumulation de métabolites. Comme pour l'ARN, on ignore la nature des protéines synthétisées en excès par les cellules infectées; il peut s'agir de protéines cellulaires, comme dans les cellules HeLa infectées par le virus de la poliomyélite (Ackermann et coll. 1959), ou de protéines spécifiques du virus, comme dans les cellules HeLa infectées par le virus de la maladie de Newcastle (Wheelock et Tamm - 1961) et dans E. coli infecté par la phage T2 (Koch et Hershey 1959). Dans les cellules infectées converties en cellules de Rous, une partie de ces protéines peut être formée par les mucoprotéines produites parfois en grande quantité (voir Goldé 1959).

L'augmentation du volume cellulaire moyen, parallèle à celle de la teneur en protéines, a été observée également dans les cellules KB infectées par les adénovirus (Green et Daesch 1961). On a constaté que cette augmentation du volume est en grande partie responsable du ralentissement puis de l'arrêt de la multiplication des cellules infectées qui confluent généralement à peu près au même moment que les cellules non infectées ; leur nombre

plus faible est en effet compensé par l'augmentation du volume total, donc vraisemblablement de la surface, et la figure 35 suggère bien que les deux populations de cellules doivent occuper la même surface dans le flacon de culture. Cependant, dans les exp. I et II, l'arrêt précoce de la multiplication des cellules infectées suggère que ces cellules peuvent s'étaler sur le verre beaucoup plus que les cellules non infectées et confluer ainsi plus tôt. On peut noter que l'arrêt de la multiplication des cellules non infectées s'accompagne de l'arrêt de l'accroissement du volume moyen de chaque cellule, traduisant un ralentissement important de leur métabolisme, alors qu'au contraire le volume moyen de chaque cellule infectée continue à croître en dépit de l'arrêt de la multiplication, traduisant ainsi le fait que le métabolisme continue à être actif.

Pour résumer l'essentiel des résultats de ces expériences, on peut dire que pendant les premiers jours qui suivent l'infection, les cellules infectées, qui se multiplient et synthétisent le matériel viral, ont une teneur globale en métabolites égale à celle des cellules non infectées. Cependant, dès que le plateau de la production virale maximum est atteint et que la multiplication cellulaire est arrêtée, les cellules infectées accumulent les nucléotides acido-solubles et les protéines.

CHAPITRE VI

DISCUSSION

Parmi les faits rapportés dans le présent travail, certains mettent en évidence les analogies qui existent entre le virus de Rous et les autres virus animaux étudiés dans les mêmes conditions; c'est le cas notamment, des caractéristiques de son cycle de multiplication, dont nous allons discuter dans le premier paragraphe de ce chapitre. D'autres faits, par contre, peuvent être considérés comme spécifiques du virus de Rous et font l'objet du second paragraphe; en particulier, l'équilibre permanent qui s'établit entre la population de cellules converties en cellules sarcomateuses et le virus sous sa forme infectieuse est, à l'heure actuelle, un phénomène presque unique en virologie animale, au moins dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées.

I - Cycle de multiplication du virus de Rous

Dans l'ensemble on peut dire que les périodes du cycle de multiplication du virus de Rous in vitro étudiées à l'échelon de la population cellulaire, ne diffèrent pas notablement de celles des autres virus, les différences étant surtout d'ordre quantitatif. On peut rappeler brièvement que la période d'éclipse du virus de Rous, d'une durée minimum de 12 heures,

est suivie d'une période d'accroissement rapide du titre du virus de trois à cinq jours, puis d'une période de stabilité qui dure aussi longtemps que les conditions de vie in vitro permettent aux cellules infectées de survivre.

En général, les virus à ARN ont une période d'éclipse de courte durée ; par exemple, les virus de l'EMC (Sanders et coll. 1958), de l'encéphalite équine, de la poliomyélite (Dulbecco et Vogt, 1954-1955), de la maladie de Newcastle (Levine et Sagik, 1956) de la peste aviaire (Franklin et Henry, 1960) ont une période d'éclipse dont la durée varie de deux à quatre heures suivant le virus considéré. La période d'éclipse du virus de Rous est donc comparativement très longue. Ce fait le rapproche d'un autre virus cancérigène, le virus du polyome, à ADN, dont la période d'éclipse a une durée (20 h.) double ou triple de celle des autres virus à ADN (voir Isaacs, 1959). Il est possible que ce point commun entre les deux virus cancérigènes ne soit pas une simple coïncidence, mais traduise la nature plus complexe des interactions de la cellule et du virus conduisant à des modifications irréversibles du métabolisme cellulaire (perte d'enzymes, Potter, 1958, - Nanney, 1958), et à la conversion néoplasique.

Dans le système cellule de poulet-virus de Rous, comme dans les autres systèmes cellule-virus animal, la période d'éclipse initiale correspond au temps minimum mis par une fraction de la population cellulaire pour synthétiser le matériel viral destiné à former les premières particules infectieuses libérées. En ce qui concerne les cellules infectées par le virus de Rous, on a vu dans le chapitre III, que cette fraction ne dépasse pas 10% de la population cellulaire un jour après l'infection; ce n'est qu'à partir du 3e ou 4e jour que toutes les cellules infectées sont productrices de virus;

l'emploi du fluoro-uracile nous a permis, par ailleurs, de démontrer que ces délais variables entre l'infection initiale et la libération des premières particules proviennent d'un asynchronisme dans le début de la synthèse du matériel viral entre les cellules d'une même culture. Cet asynchronisme, assez accentué dans le cas du virus de Rous, a été signalé aussi bien dans les populations de cellules infectées par des virus à ARN (grippe, Cairns 1957 - poliomyélite, voir Darnell et Eagle, 1960) qu'à ADN (vaccine, Cairns 1960 - polyome, Winocour et Sachs, 1960).

Les études cytochimiques des cellules de Rous ont montré que la synthèse du matériel viral paraît se produire exclusivement au sein du cytoplasme, comme il semble que ce soit le cas pour le virus de la poliomyélite (Le Brun 1957), et contrairement à ce qu'on observe pour d'autres virus à ARN, pour lesquels l'antigène viral est détectable précocément dans le noyau de la cellule (myxovirus, Liu, 1955 - Breitenfeld et Schäfer 1957).

D'autre part, on a vu que le virus de Rous n'est jamais présent sous forme de particule mure infectieuse dans le cytoplasme cellulaire, et n'acquiert l'infectiosité qu'après son passage à travers la membrane de la cellule. On ne l'identifie morphologiquement qu'à l'extérieur de la cellule ou dans des vacuoles cytoplasmiques de pynocytose (voir Bernhard, 1960). Certains virus à ARN, les myxovirus par exemple, ne sont également identifiables qu'au niveau de la membrane cellulaire et à l'extérieur des cellules (voir Rose et Morgan, 1960). Cependant, à l'inverse de certains virus appartenant à ce groupe, qui s'accumulent durant plusieurs heures au niveau de la membrane avant de s'en détacher (peste aviaire, grippe, etc..), le virus de Rous paraît être libéré dès que formé (chapitre II); La plupart des autres virus, qu'ils soient à ARN ou à ADN, sont morphologiquement distincts

dans le noyau ou le cytoplasme, où ils s'accumulent pendant des durées variables avant d'être libérés dans le milieu extérieur.

- Période de multiplication

L'accroissement rapide du titre du virus dans les cultures de c cellules de poulet infectées par le virus de Rous, qui dure de trois à cinq jours après la période d'éclipse, résulte à la fois de la libération des particules infectieuses par un nombre croissant des cellules infectées initialement, et de la multiplication des cellules déjà productrices de virus. Ceci différencie le virus de Rous de la plupart des autres virus animaux étudiés in vitro. En effet, pour ces derniers, l'infection provoque le blocage des mitoses cellulaires, soit immédiatement, soit après une période transitoire de prolifération cellulaire avec formation éventuelle de syncytium (voir Walker, 1960); dans tous les cas, les cellules infectées sont détruites après un délai variable de plusieurs heures à plusieurs jours suivant le virus considéré. Dans ces conditions, l'accroissement du titre dans les cultures de cellules infectées par un virus cytodestructeur provient uniquement de l'accroissement du nombre des cellules qui libèrent leur virus. Le double mécanisme de l'augmentation du virus de Rous est la conséquence d'une des propriétés les plus caractéristiques de ce virus; il se multiplie dans les cellules sans bloquer leurs mitoses (Rubin 1957). Il semble qu'un autre virus cancérigène, le virus de la myéloblastose aviaire, possède également la propriété de se multiplier in vitro dans les cellules de moelle de poulet sans bloquer leurs mitoses, en provoquant éventuellement leur conversion en cellules d'aspect néoplasique (Beaudreau et coll. 1960 - Baluda et Goetz, 1961). Quant au virus du polyome, virus cancérigène à ADN,

il possède deux propriétés distinctes in vitro : ou bien il se multiplie dans les cellules de souris et les détruit; ou bien, il les convertit en cellules néoplasiques non productrices de particules infectieuses.

- La période de stabilité du titre du virus de Rous qui survient après la période de multiplication correspond à l'arrêt de la multiplication des cellules productrices de virus dû à leur confluence, et à l'équilibre entre la production du virus et son inactivation thermique. On a pu maintenir sans repiquage des cultures de cellules de Rous pendant plusieurs semaines et même plusieurs mois, dans lesquelles chaque cellule était détectée comme centre infectieux et produisait en moyenne 4 à 140 UP par jour. Si l'on compare cette production moyenne à celle des cellules infectées par des virus cytodestructeurs, on peut la considérer comme étant une des plus faibles. Ainsi, la production moyenne d'une cellule infectée par un virus cytodestructeur varie de 10 unités infectieuses (peste aviaire) à 600 (poliomyélite) et 1.000 unités infectieuses (maladie de Newcastle, polyome). Cependant, cette comparaison n'a pas une grande signification étant donné que des quantités importantes de particules sont libérées en quelques heures par les populations de cellules infectées par un virus cyto-destructeur, tandis que les cellules de Rous produisent de petites quantités de particules virales pendant longtemps; dans ces conditions, la quantité globale de virus de Rous produite est en fait très supérieure à celle des virus cytodestructeurs.

II - Nature de l'association cellule-virus de Rous

Si l'on considère différentes populations de cellules de Rous obtenues après avoir infecté, à multiplicités égales, des cellules issues

d'embryons différents, on voit (chapitre III) que la production moyenne peut varier de 4 à 140 UP par cellule et par jour suivant le lot de cultures considéré. Or, on a constaté (tableau 7) que les repiquages successifs de chacun de ces lots ne modifient pas cette production moyenne, ce qui suggère l'existence d'un équilibre permanent entre la cellule de poulet convertie en cellule d'aspect sarcomateux et le virus sous sa forme infectieuse. Cette caractéristique donne au système cellule-virus de Rous une place unique parmi les autres systèmes cellule-virus animal étudiés quantitativement in vitro. Les faits observés au cours de l'étude de la multiplication du virus du polyome dans les cellules de souris pourraient suggérer qu'il y a aussi un équilibre permanent entre la cellule convertie en cellule néoplasique et le virus sous sa forme infectieuse; en fait, il semble que la faible production virale observée dans de telles cultures provient de la réinfection permanente d'une partie de la population cellulaire (Vogt et Dulbecco, 1962) créant ainsi un "état porteur" identique à celui que l'on obtient dans certaines conditions avec les virus cytodestructeurs (Puck et Cieciura, 1957). Dans ces conditions, chaque cellule qui libère du virus est détruite. D'après Dulbecco et Vogt (1960), il n'y a pas pour le virus du polyome, transmission héréditaire de la capacité des cellules infectées à produire les particules infectieuses. Il n'en est pas de même pour le virus de Rous, pour lequel la transmission héréditaire du génome viral ne fait aucun doute, étant donné que les cellules filles issues des cellules infectées initialement continuent à le produire sans requérir aucune réinfection.

L'association cellule de Rous-particules infectieuses est-elle obligatoire ? Dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées,

c'est la seule forme d'association que nous avons observée. Cependant, nous avons signalé au cours de l'introduction et à la fin du chapitre III, que dans certaines conditions (Prince, 1960 - Temin, 1962 exp. non publiées) l'infection par le virus de Rous provoque la conversion des fibroblastes en cellules néoplasiques non productrices de virus. Les résultats obtenus in vitro notamment par Temin, suggèrent que le génome viral est présent dans les cellules converties en cellules de Rous typiques, non productrices de virus, dans lesquelles aucun antigène viral n'est plus détectable. En effet, cet auteur a constaté que la surinfection de ces cellules par un variant morphologique du virus de Rous différent de celui qui a initié le processus néoplasique, "induit" la production de particules identiques à celles utilisées lors de l'infection initiale. Ces résultats montrent que le génome viral était bien toujours présent dans les cellules, ce qui ne signifie pas que sa présence est indispensable au maintien de l'état néoplasique. D'autre part, le fait que ces cellules ne produisent pas de particules infectieuses peut s'expliquer par l'inhibition de l'activité de certaines enzymes nécessaires à la synthèse des protéines virales, ou par la perte de ces enzymes, provoquant une incapacité de la cellule à produire des particules mures; dans ces conditions, on peut supposer que l'introduction de l'autre variant sous sa forme infectieuse a permis à nouveau la maturation du virus initial. Ceci présente quelque analogie avec la "réactivation" du virus de la myxomatose inactivé par la chaleur, observée quand on inocule ce dernier simultanément avec une suspension de virus du fibrome de Shope actif chez le lapin (Berry et Dedrick, 1936), ou dans

des cellules de lapin cultivées in vitro (voir Kilham, 1960). Par contre, les tentatives faites par Vogt et Dulbecco (1962) pour démontrer la persistance du génome viral dans les cellules de souris ou de hamster converties en cellules néoplasiques par le virus du polyome, ont échoué, ce qui a conduit ces deux auteurs à suggérer soit que le génome viral est présent sous une forme intégrée non décelable par aucune des techniques actuellement utilisées, soit qu'il a été éliminé de la cellule après avoir induit le processus néoplasique. Cet exemple du virus du polyome est à rapprocher d'un phénomène observé depuis longtemps in vivo et pas encore expliqué. Le virus du papillome du lapin (Shope 1933), dont le matériel génétique est un ADN, provoque des proliférations cutanées où on le trouve en abondance ; ultérieurement l'évolution de ces papillomes en carcinomes (Rous et Beard, 1935) s'accompagne, aussi bien chez le lapin sauvage que domestique, de la disparition des particules infectieuses; après plusieurs passages de la tumeur chez l'animal, on ne détecte plus l'antigène viral (Noyes et Mellors, 1957). Tout se passe comme si le virus avait été éliminé après avoir induit des processus irréversibles conduisant à la cancérisation. Aucun fait ne permet de dire que le génome viral est intégré dans les cellules tumorales et continue à jouer un rôle dans la transmission de l'état néoplasique.

D'autre part, parmi les virus non cancérigènes, le virus sigma (à ADN-L'Héritier, communication personnelle) constitue un exemple remarquable de la possibilité que peut avoir un virus animal à se reproduire selon deux processus distincts dans les tissus de l'hôte (voir L'Héritier, 1958) En effet, ce virus, qui confère à la drosophile qu'il infecte une sensibilité particulière à l'anhydride carbonique, peut se multiplier dans les tissus somatiques selon une courbe de croissance comparable à celle des autres

virus animaux ; au moment de la période d'équilibre de la production, il y a une libération continue de particules infectieuses qui se poursuit jusqu'à la mort de la drosophile. Par ailleurs, le matériel génétique du virus peut être transmis héréditairement sans qu'il y ait production de particules infectieuses : c'est l'état stabilisé, caractérisé par l'équilibre entre le virus et l'hôte. Les cellules qui renferment le matériel génétique viral peuvent spontanément produire de nouvelles particules infectieuses et sont partiellement immunes à la surinfection par le virus homologue.

Les exemples que nous venons de citer montrent que des cellules animales infectées par un virus peuvent renfermer le matériel génétique viral sans pour cela produire les particules infectieuses. En dépit des analogies que ce phénomène peut présenter avec la lysogénie (Lwoff, 1953) qui s'établit lors de l'infection des bactéries par des bactériophages tempérés, on n'a pas pu, jusqu'à présent, démontrer l'existence d'une structure "provirale" comparable au prophage des bactéries lysogènes, notamment dans le cas des virus animaux dont le matériel génétique est un ADN comme celui des bactériophages. Quant au virus de Rous, à ARN, aucun fait ne permet d'envisager la nature de l'association de son matériel génétique avec les cellules néoplasiques qui le produisent. Les résultats obtenus lors de l'emploi de la fluoro-desoxyuridine (FUDR) montrent que la synthèse d'un nouvel ADN cellulaire n'est pas nécessaire à la production des particules infectieuses par les cellules de Rous. D'autre part, on a constaté que les cellules de poulet infectées par le virus de Rous en présence de FUDR sont converties en cellules d'aspect sarcomateux; si l'on admet que

cette conversion morphologique correspond bien à la conversion des cellules infectées en cellules cancéreuses, comme le suggèrent les expériences de Temin évoquées précédemment, ceci pourrait signifier que la conversion néoplasique d'une cellule in vitro sous l'action d'un virus cancérigène à ARN peut se faire en l'absence de la synthèse d'ADN cellulaire, donc en l'absence de toute multiplication; de telles cellules, bien que cancéreuses, ne pourraient évidemment produire une tumeur chez l'animal qu'après être redevenues capables de se multiplier.

CONCLUSIONS

Au cours des expériences décrites dans ce travail, on a étudié les caractéristiques biologiques et biochimiques de la multiplication du virus dans des cellules de Rous obtenues après avoir infecté in vitro des cellules d'embryon de poule cultivées selon la méthode de Dulbecco. Les faits suivants ont été rapportés :

1/ - Cycle de multiplication du virus de Rous

Le virus de Rous n'inhibe pas la multiplication des cellules qu'il infecte, il ne les détruit pas et les convertit rapidement en cellules néoplasiques ; son cycle de multiplication, étudié à l'échelon de la population cellulaire comprend trois périodes distinctes :

- une période d'éclipse qui suit l'infection, d'une durée minimum de 12 heures,

- une période de multiplication rapide d'une durée moyenne de 4 à 5 jours qui correspond à la multiplication simultanée des cellules et du virus. On a montré que bien que toutes les cellules soient infectées initialement à des multiplicités élevées, elles ne libèrent leurs premières particules que de 1 jour à 3 jours après l'infection,

- une période d'équilibre de la production (4 à 140 U.P./cell./jour) qui correspond à une association stable entre la cellule et le virus, et qui dure aussi longtemps que les conditions de culture le permettent, c'est-à-dire 6 mois, dans nos expériences. On a démontré que

les particules ne sont infectieuses qu'à l'extérieur de la cellule, et ne semblent être formées qu'au moment où elles sont libérées.

L'étude parallèle des modifications morphologiques subies par les cellules infectées nous a permis de voir que le lieu de synthèse du matériel viral semble être uniquement cytoplasmique. L'analogie de l'aspect des cellules converties morphologiquement avec celui des cellules tumorales elles-mêmes et le fait qu'elles sont greffables, comme l'ont vu Dougherty et coll. (1961) démontrent qu'il s'agit réellement de cellules néoplasiques.

2/ - Action des inhibiteurs

L'addition des inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques et des protéines dans les milieux de cultures au cours du cycle de multiplication du virus, nous a permis d'une part, de démontrer la nature de l'acide nucléique qui porte l'information génétique du virus de Rous, d'autre part de préciser les caractéristiques de la synthèse des précurseurs du virus.

a) Le fait que la fluoro-desoxyuridine (FUDR) inhibiteur spécifique de la synthèse de l'ADN, ne réduit pas la production du virus de Rous, démontre que l'acide nucléique de ce virus est un ARN. Ce fait est en accord avec nos observations cytochimiques et avec les résultats de l'analyse chimique des particules purifiées qui vient d'être effectuée par CRAWFORD (1961).

b) L'emploi du fluoro-uracile (FU) a mis en évidence plusieurs faits :

- une partie de l'ARN des particules virales libérées précocément est synthétisée aux dépens de l'ARN et des nucléotides cellulaires présents

au moment de l'infection.

- la période d'éclipse initiale correspond au temps mis par les cellules détectées comme centres infectieux un jour et deux jours après l'infection, pour synthétiser tout le matériel viral destiné à former les premières particules infectieuses.

- le délai entre la synthèse de l'ARN viral et la libération des particules qui le renferment augmente (un à trois jours) durant la période de multiplication du virus.

- Au delà de trois jours, bien que les cellules infectées incorporent toujours le fluoro-uracile, on ne peut plus réduire la production virale par cet inhibiteur, au moins dans les limites de nos expériences (15 jours). On émet plusieurs hypothèses pour expliquer cette particularité.

- l'inhibition de la production virale par FU est distincte de l'in l'inhibition de la multiplication cellulaire; on en conclut que le fluoro-uracile inhibe bien spécifiquement la synthèse du matériel viral, et ne réduit pas indirectement la production des particules infectieuses en inhibant toutes les synthèses cellulaires. Au cours de la discussion, on suggère que la synthèse du virus de Rous peut se faire en l'absence de la synthèse d'ADN cellulaire, compte tenu des résultats des expériences effectuées avec FUDR.

c) L'emploi de la fluoro-phénylalanine (FPA a mis en évidence l'existence de deux chaînes de réactions de synthèses protéiques nécessaires à la formation des particules infectieuses et sensibles à l'action de cet inhibiteur.

L'une (a), est parallèle aux réactions aboutissant à la synthèse de l'ARN ce qui permet de réduire la production virale dans les mêmes conditions que lors de l'emploi de FU. On suggère qu'il s'agit de la synthèse d'enzymes nécessaires à la synthèse de l'ARN viral (polymérase).

L'autre (b), qui paraît se produire de quelques heures à un ou deux jours avant la libération des particules infectieuses, correspond vraisemblablement à la synthèse des protéines des capsides. La conséquence de ceci est que la FPA n'agit plus sur les réactions (a) au-delà de trois ou quatre jours après l'infection, tandis qu'elle peut toujours agir sur les réactions (b), permettant ainsi d'inhiber, à un degré d'ailleurs faible à la dose que nous avons utilisée, la production virale après cette période.

Au cours de la discussion, on effectue le rapprochement entre ces observations et celles qui ont été faites lors de l'emploi de FPA dans d'autres systèmes cellule-virus animal.

3/ - Modifications quantitatives des acides nucléiques et des protéines cellulaires au cours de la multiplication du virus

Au cours de ces expériences, on a étudié, parallèlement aux modifications chimiques subies par les cellules infectées, les modifications subies par les cellules non infectées dues aux conditions de culture.

On a vu que dans l'ensemble, les résultats des dosages des acides nucléiques des cellules infectées sont en accord avec les observations cytochimiques et avec le fait que le virus est à ARN.

- La synthèse de l'ADN n'est pas modifiée par le développement du virus.

- Les quantités d'ARN et de nucléotides acido-solubles augmentent dans les cellules infectées à partir du 2e jour pour le premier et du 4e jour pour les seconds. L'excès d'ARN est d'emblée égal à 50% de la quantité d'ARN contenue dans les cellules témoins, et reste constant durant toute l'expérience. Par contre, les quantités de nucléotides acido-solubles augmentent progressivement du 4e au 7e j. et l'excès atteint est alors égal à 70% des quantités de nucléotides présentes dans les témoins.

- Les protéines et les volumes cellulaires augmentent parallèlement et doublent du 2e au 7e jour.

L'analyse des résultats confirme que les premières particules libérées sont formées aux dépens des métabolites présents dans les cellules au moment de l'infection. De plus, si l'on admet que l'excès d'ARN présent dans les cellules infectées est de nature virale, on peut calculer qu'il représente une quantité d'ARN suffisante pour constituer le matériel génétique des particules infectieuses produites pendant 10 à 20 jours; ceci pourrait expliquer que le fluoro-uracile n'agit plus d'une façon notable sur la production virale dès le 3e jour qui suit l'infection.

Le fait que l'arrêt de la multiplication dû à la confluence ne s'accompagne pas, dans les cellules infectées, d'un arrêt de la synthèse des protéines et des nucléotides acido-solubles, contrairement à ce qui se produit dans les cellules non infectées dans lesquelles les synthèses s'arrêtent, nous conduit à suggérer que les mécanismes de régulation qui existent dans les cellules normales sont réduits ou inhibés dans les cellules de Rous.

4/ - Discussion et conclusion.

La comparaison des différentes périodes de la multiplication du virus de Rous à celles des autres virus animaux nous conduit à conclure qu'il y a surtout entre ces virus des différences quantitatives. La caractéristique essentielle du système cellule-virus de Rous est l'association stable qui existe entre le génome viral et les cellules infectées, lesquelles se multiplient en conservant la capacité de produire les particules infectieuses. On évoque néanmoins la possibilité que les cellules de Rous peuvent contenir le génome viral sans produire de particules infectieuses et l'on compare cette situation à celle d'autres virus cancérigènes et non cancérigènes.

Pour conclure, on suggère que la synthèse du virus de Rous sous sa forme infectieuse d'une part, et la conversion néoplasique de la cellule infectée d'autre part, sont deux phénomènes indépendants pouvant se produire en l'absence de la synthèse d'un nouvel ADN cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

ABERCROMBIE, M. HEAYSMAN, E.M.J. : Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. I/Speed of movement of chick heart fibroblasts in relation to their mutual contacts. Exp.Cell.Res. (1953) 5; II-129.

ABERCROMBIE, M., HEAYSMAN, E.M.J. and KARTHAUSER, M.M. : Social behaviour of cells in tissue culture. III/Mutual influence of sarcoma celles and fibroblasts. Exp.Cell.Res. (1957) I3,276-29I.

ACKERMANN, W.W. : Cellular aspects of the cell virus relationship. Bact.Revs. (1958) 22, 223-239.

ACKERMANN, W.W. and MAASSAB, H.F. : Growth characteristics of influenza virus Biochemical differenciation of stages of development. Jl. Exp.Med. (1955) 102, 393-402.

ACKERMANN, W.W., LOH.P.C. and PAYNE, F.: Studies of the biosynthesis of protein and ribonucleic acid in Hela cells infected with poliovirus. Virology (I959) 7, I70-I83.

AMIES, C.R. : The particulate nature of avian sarcoma agents. Jl.Path.a.Bact. (I937) 44, I4I-I66.

AMIES, C.R. and CARR, J.G.: Immunological experiments with highly concentrated suspensions of the Rous Sarcoma I tumor producing agent. Jl. Path.a.Bact. (I939) 49, 497-5I3.

ANDREWES, C.H.: The active immunication of pheasants against fowl tumors Jl. Path.a.Bact. (1933) 37, 17.

ANDREWES, C.H. : Further serological studies on fowl tumor viruses. Jl.Path.a. Bact. (I933) 37, 27.

ANDREWES, C.H. : The occurence of neutralizing antibodies for Rous sarcoma virus in the sera of young "normal" chicks. Jl. Path.A.Bact. (I939) 48, 225.

BALUDA, M.A. and GOETZ, I.E. : In vivo infectivity studies with avian myeloblasts virus. Virology (I96I) I4, 33-45.

BARSKI, G., ENDO M. et MONACI, V. : Etude préliminaire des lésions cellulaires de la poliomyélite sur une couche de fibroblastes humains. Ann.Inst.Past. (I953) 85, 264.

BATHER, R. : Some observations on an ascitic Rous N° I sarcoma.Brit. Jl.Canc. (I954) (a) 8, 132-I40.

BATHER, R. : Growth characteristics of the Rous N° I sarcoma grown in the peritoneal cavity of chickens. Brit.Jl.Canc. (I954) (b) 8, 535.

ACKERMANN, W.W. ; RABSON, A. and KURTZ, H. : Growth characteristics of poliomyelitis virus in HeLa cell cultures : lack of parallelism in cellular injury and virus increase. Jl.Exp.Med. (1954) I00 , 437

BAYER, R. : The nucleic acid content of partially purified Rous N° I sarcoma virus. Brit.Jl.Canc. (I957) II, 6II-6I9.

BEARD, J.W. : Etiology of avian leukosis. Ann.N.Y.Acad.Sci. (I957) 68, 473

BEAUDREAU, G.S., BECKER, C., BONNARD, R.A., WALLBANK, A.M., BEARD, D. and BEARD J.M. Virus of avian myeloblastosis. XIV/Neoplastic response of normal chiken bone narrow treated with the virus in tissue culture. Jl. Nat.Canc.Inst. (I960) 24, 395-4I5.

BEIJERINCK, M.W. : Uber ein contagium vivum fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabaksblâtter.Verh.Akad.Wet.Amst. (I898) 6, fas 5.

BENEDETTI, E.L. et BERNHARD, W. : Recherches ultrastructurales sur le virus de la leucémie erythroblastique du poulet. Jl.Ultrast.Res. (1958) I 309-336.

BERGS, V.V. and GROUPE, V.V. : Critical factors in successfull recovery of Rous sarcoma virus from turkey tumors. Science (1961) 134, 192.

BERNHARD, W., OBERLING, C. et VIGIER, P. : Ultrastructure du virus dans le sarcome de Rous : leur rapport avec le cytoplasme des cellules tumorales. Bull.Canc. (1956) 43, 407-522.

BITTNER, J.J. : Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. Science (I936) 84, 162.

BORREL, A. : Cytologie du sarcome de Peyton Rous et substance spécifique. Compt.Rend.Soc.Biol. (1926) 94, 500.

BORSOS, T. and BANG, F.B. : Quantitation of hemorrhagic lesions in the chick embryo produced by the Rous tumor virus. Virology (1957) 4, 385-391.

BOSCH, L., HARBERS, E. and HEIDELBERGER, C. : Studies on fluorinated pyrimidines IV/Effects on nucleic acid metabolism in vitro.Canc.Res. (1958) 18, 335.

BRYAN, W.R. : Quantitative studies on the latent period of tumors induced with subcutaneous injection of the agent of chicken tumor I I/Curve relating dosage of agent and chicken response. Jl.Nat.Canc.Inst. (1946) 6, 225-237.

BRYAN , W.R. : II/Estimation of the latent period. Jl.Nat.Canc.Inst. (1956) 6, 373-377.

BRYAN , W.R. : Biological studies on the Rous sarcoma virus. II/Review of sources of experimental variation and methods for their control. Jl.Nat. Canc.Inst. (1955) 16, 287-315.

BRYAN, W.R. : Biological studies, on the Rous sarcoma virus. IV/Interpretation of tumor responsable data involving one inoculation site per chicken Jl.Nat.Canc.Inst. (1956) 16, 843-863.

BRYAN, W.R. : Interpretation of host response in quantitative studies on animal virus. Ann.N.Y.Acad.Sci. (1957) 69, 698-728

BRYAN, W.R. , CALNAN, D, and MOLONEY, J.B. : Biological studies on the Rous sarcoma virus. III/The recovery of virus from experimental tumors in relation to initiating dose. Jl.Nat.Canc.Inst. (1955) 16, 317-335.

BRYAN, W.R., MAVER,M.E. , MOLONEY, J.B. ; WOOD, M.T. and WHITE, C.L. : Comparative stability of the agent of chicken tumor I in citrate and phosphate buffers at 37°C. Jl.Nat.Canc.Inst. (1950) II, 269-277.

BRYAN, W.R., and MOLONEY, J.B. : Rous sarcoma virus : on purification problem. Ann. N.Y.Acad.Sci. (1957) 68, 441-453.

BRYAN, W.R., MOLONEY, J.B. and CALNAN, D. : Stable standard preparations of the Rous sarcoma virus preserved by freezing and storage at low temperature. Jl.Nat.Canc.Inst. (1954) 15, 315-329.

BURMESTER, B.R.; PRICKETT, C.O. and BELDING, T.C.: A filterable agent producing lymphoïd tumors and osteopetrosis in chicken. Canc.Res. (1946) 6, 189.

BURMESTER, B.R.; FONTES, A.K. : Contact transmission of Rous sarcoma. Jl.Nat.Canc.Inst. (1960) 25, 307-313.

BURMESTER, B.R. and GENTRY, R.F. : On transmission of avian visceral lymphomatosis by contact. Canc.Res. (1954) 14, 34-42.

BURNET, F.M. : A virus disease of the canary of the fowl pox group. Jl. Path.a. Bact. (1933) 37, 107.

BURTON, N. : A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorometric estimation of deoxydribonucleic acid. Biochem. J. (1956) 62, 315-323.

BERNHARD, W. : The detection and study of tumor viruses with the electron microscope. Canc.Res. (1960) 20, 712-727.

BERRY, G.P. and DEDRICK, H.M. : Further observations on the transformation of the virus of rabbit fibroma (Shope) into that of infectious myxomatosis (Sanarelli). Jl.Bact. (1936) 32, 356.

BREITENFELD, P.M. and SCHAFER , W. : The formation of fowl plague virus antigens in infected cells, as studied with fluorescent antibodies. Virology (1957) 4, 328.

BROWN, F. and STEWART, D.L. : The influence of proflavine on the synthesis of foot-and-mouth disease virus. J.Gen.Microb. (1960) 23, 369-379.

CAIRNS, H.J.F. : The asynchrony of infection by influenza virus. Virology (1957) 3, I-14

CAIRNS, H.J.F. : The initiation of vaccinia infection. Virology (1960) II 603-623.

CARR, J.G. : The absence of a seasonal influence upon the Rous N° I sarcoma in young chick. Brit.Jl.Exp.Path. (1942) 23 - 339-342.

CARR, J.G. : The relation between age, structure and agent content of Rous N° I sarcoma. Brit.Jl.Exp.Path. (1943) 24, 133-137.

CARR, J.G. : Experiments on the inhibitor occurring in Rous N° I sarcoma. Brit.Jl.Exp.Path. (1944) 25, 56.

CARR, J.G. and HARRIS, R.J.C. : The preparation and assay of the Rous N° I sarcoma agent. Brit.Jl.Canc. (1951) 5, 83-94.

CARR, J.G.:On mode of multiplication of the Rous N° I sarcoma virus. Proc. Roy. Soc. Edinburgh (1953) 65, 66.

CARREL, A. : Technique for cultivating a large quantity of tissue. jl. Exp.Med. (1912) 15, 393.

CARREL, A. : Action de l'extrait filtré du sarcome de Rous sur les macrophages du sang. Compt.Rend.Soc.Biol. (1924) 91, 1069.

CARREL, A. : Cultures pures de fibroblastes provenant de sarcomes fusocellulaires. Compt.Rend.Soc.Biol. (1924) 90, 1380-1382.

CARREL, A. : La malignité de cultures pures de monocytes de sarcome de Rous. Compt.Rend.Soc.Biol. (1924) 91, 1067-1069.

CARREL, A. : Essential characteristics of a malignant cell. J.A.M.A. (1925) 157-158.

CARREL, A. : Some conditions of the reproduction in vitro of the Rous virus Jl.Exp.Med. (1926) 43,647.

CERIOTTI, G. : Determination of nucleic acids in animal tissues. JL. Biol.Chem. (1955) 214, 59-70.

CHAUDHURI, N.K., MONTAG, B.J. and HEIDELBERGER, C. : Studies on fluorinated pyrimidines. III/The metabolism of 5 fluorouracil 2-C14 and 5 Fluoroorotic 2-C14 acid in vivo. Canc.Res. (1958) 18, 318.

CLAUDE, A. : Properties of the causative agent of a chicken tumor. XIII/Sedimentation of the tumor agent, and separation from the associated inhibitor Jl.Exp.Med. (1937) 66, 467-468.

CLAUDE, A. : Concentration and purification of chicken tumor I agent. Science (1938) 87, 467-468.

CLAUDE, A. :"Spreading" properties and mycolytic activity of leech extracts. Proc. Soc.Exp.Biol.a.Med (1940) 43, 684,689.

CLAUDE, A. and ROTHEN, A. : Properties of the causative agent of a chicken tumor XIV/Relation between a tumor nucleoprotein and the active principle Jl.Exp.Med. (1940) 71, 619-633.

CLAUDE, A. ; PORTER, K.R. and PICKLES, E.G. : Electron microscope study of chicken tumor cells.Canc.Res. (1947) 7, 421-430.

COHEN, S.S. : The origin of the phosphorus bound in the deoxyribonucleic acids of the T2 and T4 bacteriophages. Jl.Biol.Chem. (1948) 174, 281-294.

COHEN, S.S. ; FLAKS, J.G. ; BARNER, H.D. ; LOEB, M.R. and LICHTENSTEIN J. : On mode of action of 5 fluorouracil and its derivatives. Proc.Nat.Acad.Sci. (1958) 44, 1004-1013.

CONSTANTIN, T. ; FEBVRE, H. et HAREL, J. : Cycle de multiplication du virus du fibrome de Shope in vitro (souche OA) Compt.Rend.Soc.Biol. (1956) 350, 347.

CRAWFORD, LV. : A study of the Rous sarcoma virus by density gradient centrifugation. Virology (1960) 12, 143-153.

CRAWFORD, L.V. and CRAWFORD, E.M. : The properties of Rous sarcoma virus purified by density gradient centrifugation. Virology (1961) 13, 227-232.

COHEN, G.N. and MUNIER, R. : Effets des analogues structuraux d'amino-acides sur la croissance, la synthèse de protéines et la synthèse d'enzymes dhez Escherichia coli. Biochim. et Biophys. Acta (1959) 31, 347-356.

DANNEBERG, P.B. ; MONTAG, B.J. and HEIDELBERGER, C. : Studies on fluorinated pyrimidines IV/Effects on nucleic acid metabolism in vivo. Canc.Res. (1958) 18, 329-334.

DARNELL, J.E. and LEVINTOW, L. : Poliovirus protein : source of amino-acids and time course of synthesis. Jl.Biol.Chem. (1960) 235, 74-76.

DIAMOND, L. and BALIS. E., : A possible role of host ribonucleic acid in poliovirus synthesis. Virology (1961) 15, 210-211.

DOLJANSKI L. and TENENBAUM, E. : Studies on Rous sarcoma cells cultivated in vitro. I/Cellular composition of pure cultures of Rous sarcoma cells. Canc. Res. (1942) 2, 776-785.

DOUGHERTY, R.M., STEWART, J.A. and MORGAN H.R. : Quantitative studies on the relationship between infecting dose of Rous sarcoma virus, antiviral immune response and tumor growth in chicken. Virology (1960) II, 349-370.

DOUGHERTY, R.M. and MORGAN, H.R. : Comparatives studies in Rous sarcoma with virus tumor cells and chick embryo cells transformed in vitro by virus II/Response of normal and immunized chicks. Jl.Exp.Med. (1962) 115, 245-252.

DRAYTON, H.A. : Inactivation of Rous virus by phospholipase A. Nature (1961) 192, 896.

DULBECCO, R. : Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of animal virus. Proc. Nat.Acad.Sci.Wash. (1952) 38, 747-752.

DULBECCO, R. and WOGT, M. : One step growth curve of western equine encephalomyelitis virus on chicken embryo cells grown in vitro an analysis of virus yields from single cells. Jl.Exp.Med. (1954) 99, 183.

DULBECCO, R. and VOGT, M. : Biological properties of poliomyelitis viruses as studied by the plaque technique. Ann.N.Y.Acad.Sci. (1955) 61, 790-800.

DULBECCO, R. and VOGT, M. : Significance continued virus production in tissue cultures rendered neoplastic by polyoma virus. Proc.Nat.Acad.Sci. (1960) 46, 1617-1623.

DUNN, D.B. and SMITH, J.D. : Incorporation of halogenated pyrimidines into the deoxyribonucleic acids of bacterium coli and its bacteriophages. Nature (1954) 174, 305-306.

DUNNEBACKE, T.H. and REAUME, M.B. : Correlation of the yield poliovirus with the size of isolated tissue cultured cells. Virology (1958) 6, 8-13.

DURAN-REYNALS, F. : The infection of turkeys and guinea fowl by the Rous sarcoma virus and the accompanying variations of the virus. Canc.Res. (1943) 13, 569.

DURAN-REYNALS, F. : Transplantability and presence of virus in spontaneous sarcomas and fibromas of chickens in relation to the age of the tumor-bearing animal. Canc.Res. (1946) 6, 529.

DURAN-REYNALS F. : Virus-induced tumors and the virus theory of cancer in the physiopathology of cancer. New-York Paul B.Hoeber Inc. (1953).

DURAN-REYNALS, F. ; BURMESTER, B.R. ; COTTRAL, G.E. and BRYAN, E. Studies on the origin of the naturaly occurring antibodies againts tumor viruses developing in again chickens. Canc.Res. (1953) 13, 408-414.

DURAN-REYNALS, F. and FREIRE, P.M. : The age of the tumor bearing hosts as a factor conditioning the transmissibility of a chicken sarcoma by filtrates and cells. Canc.Res. (1953) 13, 376-382.

EAGLE, H. and HABEL, K. : The nutritional requirements for the propagation of poliomyelitis virus by the HeLa cell. Jl.Exp.Med (1956) 104, 271-287.

EDLINGER, E. : Uber die virus versteilung in Zelsuspensionen des Rous' schen Huhnersarkoms. Acta.Biol.und.Med. Germanica (1958) 4, 486-495.

ELFORD, W.J. and ANDREWES, C.H. : Estimation of the size of a fowl tumor virus by filtration through graded membranes. Brit.Jl.Exp.Path. (1935) 16, 61.

ELLERMAN, V. and BANG, O. : Experimentelle Leukämia bei Hühnern. Zbl.Bakt. (1908) 46, 495-609.

ELLERMAN, V. : Leucosis of fowls and leukemia problems. Gyldendal London (1921).

ENGELBRETH-HOLM, J. : Spontaneous and experimental leukemia in animals. Edimburgh and London Oliver and Bayd (1942).

EPHRUSSI, B. and TEMIN, H.M. : Infection of chick Iris epithelium with the Rous sarcoma virus in vitro. Virology (1960) II, 547.

EPSTEIN, M.A. : The effects of cold and desiccation on the tumour producing activity of the cells and the virus of the Rous N° I fowl sarcoma Brit.Jl. Cand. (1951) 5, 317.

EPSTEIN, M.A. : On identification of the Rous virus : a morphological and biological study. Brit.Jl.Canc. (1956) 10, 33-48.

EPSTEIN, M.A. : Observations on the Rous virus, fine structure and relation to cytoplasmic vacuoles. Brit.Jl.Canc. (1957) II, 268-273.

EPSTEIN, M.A. : Composition of the Rous virus nucleoïd. Nature (1958) 181, 1808.

EPSTEIN, M.A. and HOLT, S.L. : Observations on the Rous virus : integrated selection microscopical and cytochemical studies on the fluorocarbon purified preparations. Brit.Jl.Canc. (1958) 12, 363-369.

ERICHSEN, S. ; ENG, J. and MORGAN, H.R. : Comparative studies in Rous sarcoma with virus tumors cells, and chick embryo cells transformed in vitro by virus. I/Production of mucopolysaccharides. Jl.Exp.Med. (1961) 114, 435.

FAIRMAN, M. : The effects of 5 fluorouracil on Rous sarcoma infection in vitro. Jl.Gen.Micro. (1959) 20 ii-iii.

FISCHER, A. : Sur la culture pure de cellules sarcomateuses entretenues pendant une année in vitro. Compt.Rend. Soc.Biol. (1924) 91, 1105-1107.

FISCHER, A. : On the protein metabolism of tissue cell in vitro. Jl.Nat.Canc. Inst. (1953) 13, 1399-1423.

FISCHER, A. ; PUCK, T.T. and SATO, G. : Molecular growth requirements of single mammalian cells : the action of fetuin in promoting cell attachment to glass. Proc.Nat.Acad.Sci. (1958) 44, 4-10.

FOULDS, L. : The filterable tumors of fowls : a critical review. Eleventh Scienc.Report.Imp.Canc.Res.Fund.Supplement Londres, Taylor and Francis (1934).

FRANKLIN, R.M. : The synthesis of fowl plague virus products in a proflavine inhibited tissue culture system. Virology (1958) 6, 525-539.

FRANKLIN, R.M. and HENRY, Cl. : The multiplication of fowl plague virus in tissue cultures of chick embryo cells. Virology (1960) 10, 406-418.

FREIRE, P.M., BRYAN, E. and DURAN-REYNALS, F. : Growth and regression of the Rous sarcoma as a fonction of the age of the host. Canc.Res. (1953) 13 386-388.

FREIRE, P.M. and DURAN-REYNALS, F. : On development of metastases from the Rous sarcoma in relation to some characteristics of its causative virus. Canc. Res. (1953) 13, 383-385.

FRAENKEL-CONRAT, H. : The role of the nucleic acid in the reconstitution of active tabacco mosaic virus. Jl.Amer.Chem.Soc. (1956) 78, 882-883.

FRIEND, C. : Leukemia of adult mice caused by a transmissible agent. Ann.N.Y. Acad.Sci. (1957) 68, 522-532.

FRIESEN, B. and RUBIN, H. : Some physicochemical and immunological properties of an avian leukosis virus. Virology (1961) 15, 387-396.

GAYLORD, W.H. : Virus like particles associated with the Rous sarcoma as seen in sections of the tumor. Canc.Res. (1955) 15, 80-83.

GIERER, A. and SCHRAMM, G. : Die Infektiosität der Nucleinsäme aus der Tabak mosaïkvirus. Z.Naturforsch. (1956) IIb, 138-142.

GINSBERG, H.S. and DIXON, M.K. : Nucleic acid synthesis in types 4 and 5 adenovirus infected Hela cells. Jl.Exp.Med. (1961) 113, 169-176.

GOLDÉ, A. : Les mucopolysaccharides dans quelques sarcomes aviaires cultivés in vitro. Compt.Rend.Soc.Biol. (1956) 2, 349.

GOLDÉ, A. : Etude quantitative des modifications cellulaires provoquées par le virus du sarcome de Rous dans les cultures embryonnaires de poulet. Exp.Cell. Res. (1959) 18, 528-541.

GOLDÉ, A. : Chemical changes in chick embryo cells infected with Rous sarcoma virus. Virology (1962) 16, 9-20.

GOLDÉ, A. and VIGIER, P. : Inactivation in vitro du virus du sarcome de Rous par un mucopolysaccharide isolé de l'ascite sarcomateuse. Ann.Inst.Past. (1959) 97, 227-233.

GOLDÉ, A. et VIGIER, P. : Inhibition du développement du virus du sarcome de Rous par le 5-fluorouracile, en culture de tissus. Compt.Rend.Acad.Sci. (1961) 252, 1693-1695.

GOLDÉ, A. and VIGIER, P. : Growth of Rous sarcoma virus and cells in non-confluent chick embryo monolayers. Virology (1961) 15, 36-46.

GRAFFI, A. : Chloroleukemia of mice. Ann. New-York Acad.Sci.(1957) 68, 540-558

GREEN, M. and DAESCH, G.E. : Biochemical studies on adenovirus multiplication. II/Kinetics of nucleic acid and protein synthesis in suspension cultures Virology (1961) 13, 169-176.

GREENWOOD, A.W. ; BLYTH, J.S.S. and CARR, J.G. : Indications of the heritable nature of non-susceptibility to Rous sarcoma in fowls. Brit.Jl.Canc. (1948) 2, 135.

GROS F. and NAONO, S. : Bacterial Synthesis of "modified" enzymes in the presence of a pyrimidine analogue (1960) Symposium on protein Synthesis. Published by Academie Press Inc. (London) Ltd 195-205.

GROSS, L. : "Spontaneous" Leukemia developping in C3H mice following inoculation in infancy with AK leukemic extracts or AK embryos. Proc. Soc. Exp.Biol. and Med. (1951) 76, 27.

GROSS, L. : A filterable agent recovered from A.L. leukemic extracts, causing salivary gland carcinoma in C3H mice. Proc.Soc.Exp.Biol. and Med. (1953) 83, 414.

GROSS, L. : Serial cell-free passage of a radiation activated mouse leukemia agent. Proc.Soc.Exp.Biol.a.Med. (1959) 100, 102-105.

GROUPE, V ; FRANK, J. ; RAUSCHER, F.J. ; LEVINE, A.S. and BRYAN, W.R. : The brain of newly hatched chicks as a host virus system for biological studies on the Rous sarcoma virus. Jl.Nat.Canc.Inst. (1956) 16.

GROUPE, V. ; DUNKEL, V.C, and MANAKER, R.A. : Improved pock counting method for the titration of Rous sarcoma virus in embryonated eggs. Jl. Bact. (1957) 74, 409-410.

GROUPE, V. ; and RAUSCHER, F.J. : Growth curve of Rous sarcoma virus and relationship of infecting dose to yield of virus in chick brain. Jl.Nat.Canc.Inst. (1957) 18, 507.

GROUPE, V. and RAUSCHER, F.J. : Factors contributing to production of "virus-free" tumors in turkeys by Rous sarcoma virus. Sci. (1959) 129, 1022

GYE, W.E. and ANDREWES C.H. : A study of the Rous fowl sarcoma N° I.I/Filtrability. Brit.Jl.Exp.Path. (1926) 7, 81-87.

GYE, W.E. and PURDY, W.J. : The cause of cancer. London, Cassel and Company Ltd (1931).

HAGUENAU, F. ; DALTON A.J. and MOLONEY, J.B. : A preliminary repord of electron microscopic and bio-assay studies on the Rous sarcoma virus. Jl.Nat.Canc.Inst. (1958) 20, 633-644.

HALBERSTAEDTER, L. ; DOLJANSKI, L. and TENENBAUM, E. : Experiments on the cancerization of cells in vitro by means of Rous sarcoma agent. Brit. jl. Exp.Path. (1941) 22, 179.

HARDING, C.V. ; HARDING, D. and Mc LIMANS, W.F. : Cytological changes accompanying the growth of poliomyelitis virus in cells of human origin (strain HeLa) Virology (1956) 2, 109.

HAREL, J. : Titration et étude du cycle de multiplication in vivo du virus fibromateux de Shope dans les tumeurs malignes du lapereau. Compt.Rend.Soc. Biol. (1956) 150, 139.

HARRIS, R.J.C. : Multiplication of Rous N°I sarcoma agent in the chorio-allantoic membrane of the embryonated eggs, Brit.Jl.Canc. (1954) 8, 73a

HARRIS, R.J.C., MALMGREEN, H. and SYLVEN, B. : The polysaccharides of Rous sarcoma N° I. Brit.Jl.Canc. (1954) (1) 8, 141.

HARRISON, R.B. : Observations on the living developping nerve fiber.

HARTMAN, S.C. and BUCHANAN, J.M. : Nucleic acids, purines, pyrimidines (nucleotide synthesis) Ann.Rev.Biochem. (1959) 28, 365-410.

HALVORSON, H.O. and SPIEGELMANN, S. : The inhibition of enzyme formation by amino-acid analogues. Jl.Bact. (1952) 64, 207-221.

HENLE, W. HENLE, G. and ROSENBERG, E. : The demonstration of one-step growth curves of influenza viruses through the blocking effect of irradiated virus on further infection. Jl.Exp.Med. 1947 - 86, 423-437.

HENLE, W. : Studies on host-virus interactions in the chick embryo influenza system. II- The propagation of virus in conjunction with the host cells. Jl. Exp.Med. (1959) 90, 13.

HERRIOTT, R.M. : Infectious nucleic acids, a new dimension in virology ; their release from infected tissues and resistance to antibodies may explain some anomalous conditions. Science (1961) 134, 256-260.

HERSHEY, A.D. and CHASE, M. : Independant functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. Jl.Gen.Physiol. (1952) 36, 39.

HERSHEY A.D. ; DIXON J. and CHASE, M. : Nucleic acid economy in bacteria infected with bacteriophage T2.I/Purine and pyrimidine composition. Jl.Gen.Physiol. (1953) 36, 777-789.

HERSHEY A.D. : Nucleic acid economy in bacteria infected with bacteriophage T2. II/Phage precursor nucleic acid. Jl.Gen.Physiol. (1954) 37, I,24

HILL, R.B. : BENSCH, K.G. ; SIMMONIS S. and KING, D.W. : Variability of content of deoxyribonucleic acid in L-strain fibroblasts. Nature (1959) 183 1818-1819

HOROWITZ, J. and CHARGAFF, E. : Massive incorporation of 5 fluorouracil into a bacterial ribonucleic acid. Nature (1959) 184, 1213-1215.

HOROWITZ, J ; SANKKONEN, J.J. and CHARGAFF, E. : Enzyme synthesis in E.coli treated with 5 fluorouracil. Federation Proc. (1960) 19, 350.

HOYLE, L. : The growth cycle of influenza virus A : a study of the relations between virus, soluble antigen and host cell in fertile eggs inoculated with influenza virus. Brit. Jl. Exp.Path. (1948) 29, 390.

ISAACS, A. : Viral interference virus growth and variation. 9 th symposium of the soc.For gen. mic. University Press Cambrige (1959) 102-121.

ISAACS, A. : Biological aspects of intra-cellular stages of virus growth. The viruses.Acad.Press,Inc.London (1959 b) 3, III-156

KABAT, E.A. : Polysaccharides in tumor due to virus of leucosis and sarcoma of fowl. Jl.Biol.Chem. (1939) 130, 143.

KAHLER, H. ; BRYAN, W.R. ; LLOYD, B.J. and MOLONEY, B.J. : On density of Rous sarcoma virus in sucrose solutions. Jl.Nat.Canc.Inst. (1954) 15, 331-336

KAPLAN, A. and BEN-PORAT, T. : The effect of pseudorabies virus on the nucleic acid metabolism and on the nucleic of rabbit kidney cells. Virology (1959) 8, 352-366.

KAPLAN, A. and BEN-PORAT, T. : The action of 5 fluorouracil on the nucleic acid metabolisms of pseudorabies virus infected and noninfected rabbit kidney cells. Virology (1961) 13, 78-92.

KENZY, S.G. : Studies on avian neoplasia I/Quantitative evaluation of neutralizing antibodies for the Rous sarcoma virus in avian serums. Am.Jl.Vet.Res. (1952) 13, 388-394.

KEOGH, E.V. : Ectodermal lesions produced by the virus of Rous sarcoma. Brit.Jl.Exp.Path. (1938) 19, I.

KILHAM, L. : The fibroma-myxoma virus transformation (1960) 7, 103-129.

KOCH, G. and HERSHEY, A.D. : Synthesis of phage precursor protein in bacteria infected with T2. Jl.Mol.Biol. (1959) I, 260-276.

LEBRUN, J. : L'antigène poliomyélitique au cours du développement intracellulaire du virus. Ann.Inst.Past. (1957) 93, 225

LEDINKO, N. : Production of noninfectious complement fixing poliovirus particles in Hela cells treated with proflavine. Virology (1958) 6, 512.

LEVINE, S. and SAGIK, B.P. : The interactions of Newcastle disease virus with chick embryo tissue culture cells-attachment and growth. Virology (1956) 2, 57-68.

LHÉRITIER, Ph.: The hereditary virus of Drosophila (1958) Advances in virus Research, 5, 195-245

LIU, CH., Studies on influenza infection in ferrets by means of fluorescein labelled antibody. I/The pathogenesis and diagnosis of the disease. Jl.Exp. Med. (1955) 101, 665-676.

LIU, CH. : Studies on influenza infection in ferrets by means of fluorescein labelled antibody. II/The role of "soluble" antigen in nuclear fluorescence and cross reactions. Jl.Exp.Med. (1955 b) 101, 677-686.

LO, W.H., and BANG, F.B. : Rous sarcoma virus infection in the chick embryo. I/Pathogenesis of the Rous sarcoma virus infection in the chick embryo with particular emphasis on the hemorrhagic disease. Bull.Johns.Hopkins.Hosp. (1955) 97, 227-247.

LO, W.H. ; GEY, G. and SCHAPRAS, P. : The cytopathogenic effect of the Rous sarcoma virus on chicken fibroblasts in tissue cultures. Bull;Johns.Hopkins. Hosp. (1955) 97, 248-264.

LOEFFLER, F. und FROSCH,: Summarischer Bericht über der Kommision zur Erforschung der Maul und Klauenseuche bei dem Institut für Infektions krankheiten in Berlin.Controlbl.Bakt. (1897) Abt.I, 22

LOOMIS, L. and PRATT, A.W. : The histogenesis of Rous sarcoma I induced by partially purified virus. Jl.Nat.Canc.Inst. (1956) 17, 101.

LOWRY, O.H. ; ROSEBROUGH, N.J.; FAIR, A.L. and RANDALL, R.J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent.Jl.Biol.Chem. (1951) 193, 265-275.

LUDFORD, R.J. : Production of tumors by cultures of normal cells treated with filtrats of filterable fowl tumors. Am.Jl.Canc. (1937) 31, 414.

LWOFF, A. : Lysogeny. Bact.Rev. (1953) 17, 269-337.

LWOFF, A. 1954 - Control and Interrelations of metabolic and viral diseases of Bacteria - The Harvey Lectures, séries L, Academic Press, 92.

MAASSAB, H.F. ; LOH, P.C. and ACKERMANN, W.W. : Growth characteristics of poliovirus in Hela cells : nucleic acid metabolism. Jl.Exp.Med. (1957) 106 641-648.

MAC-INTOSCH J. : The sedimentation of the virus of Rous sarcoma and the bacteriophage by a high speed centrifuge. Jl.Path.a.Bact. (1935) 41, 215

MAGEE, W.E. and SAGIK, B.P. : Thesynthesis of deoxyribonucleic acid by Hela cells infected with vaccinia virus. Virology (1959) 8, 134-137.

MANAKER, R.A. and GROUPE, V. : Discrete foci of altered chicken embryo cells associated with Rous sarcoma virus in tissue culture. Virology (1956) 2, 838

MESELSON, M. ;STAHL, F.W. and VINOGRAD, J. : Equilibrum sedimentation of macromolecules in density gradients. Proc.Nat.Acad.Sci. (1957) 43-581

MILFORD, J.J. and DURAN-REYNALS, F. : Growth of a chicken sarcoma virus in the chick embryo in the absence of neoplasia. Canc.Res. (1943) 3, 578

MOLONEY, J.B. : Biological studies on the Rous sarcoma virus. V-Preparation of improved standard lots of the virus for use in quantitative investigation. Jl.Nat.Canc.Inst. (1956) 16, 877.

MORGAN, J.F. : Tissue culture nutrition. Bact.Rev. (1958) 22, 20-45

MORGAN, J.F. and MORTON H.J. : The nutrition of animal tissues cultivated in vitro. IV-Amino-acid requirements of chick embryonic heart fibroblasts. Jl.Biophys.Biochem.Cytol.(1957)3, 141-150.

MUNIER, R. et COHEN, G.N. : Incorporation d'analogues structuraux d'amino-acides dans les proteines bactériennes au cours de leur synthèse in vitro. Biochim. et Biophys. Acta (1959) 31, 378-391.

NANNEY, D.L. : Epigenetic control systems. Proc.Nat.Acad.Sci. (1958) 44, 712

NEWTON, A. and STOKER, M.G. : Changes in nucleic acid content of Hela cells infected with herpes virus. Virology (1959) 8, 134-137.

NOYES, W.F. and MELLORS, R.C. : Fluorescent antibody detection of the antigens of the Shope Papilloma virus in papillomas of the wild and domestic rabbit. Jl.Exp.Med. (1957) 106, 555-562.

OBERLING, C. and GUERIN, M. : On role of viruses in the production of cancer Adv.in Canc.Res. (1954) 2, 353-423.

PERRY, V.P. ; EVANS, V.P. and EARLE, W.R. : Cultivation of large cultures of Hela cells in horse serum. Science (1955) 121, 805.

PONTEN, J. : Growth and infective virus content of Rous sarcoma cells. Acta. Path.a.Mic.Scand. (1956) supp 110.

POTTER, V.R. : The biochemical approach to the cancer problem. Fed. Proc. (1958) 691-697.

PRINCE, A.M. : Quantitative studies on Rous sarcoma virus. I/The titration of Rous sarcoma virus on the chorio-allantoïc membrane of the chick embryo. Jl.Nat.Canc.Inst. (1958a) 20, 147-158.

PRINCE, A.M. : Quantitative studies on Rous sarcoma virus. III/Virus multiplication and cellular response following infection of the chorio-allantoïc membrane of the chick embryo. Virology (1958b) 5, 435.

PRINCE, A.M. : Quantitative studies on Rous sarcoma virus. IV/An investigation of the nature of "non infective" tumors induced by low doses of virus. Jl.Nat.Canc.Inst. (1959) 23, 1361-1381.

PRINCE, A.M. : Quantitative studies on Rous sarcoma virus. V/An analysis of the mechanism of virulence of the Bryan "high titer" strain of RSV. Virology (1960a) II, 371-399.

PRINCE, A.M. : Quantitative studies on Rous sarcoma virus. IV/Clonal analysis of in vitro infections. Virology (1960b) II, 400-424.

PUCK,TT ; MARCUS, P.I. and CIECIURA, S.J. : Clonal growth of mammalian cells in vitro. Jl.Exp.Med. (1956) 103, 273-283.

PUCK, TT. and CIECIURA, S.J. : Symposium on latency and masking in viral and rickettsial infections.Eds.Duard.L.Walker et COLL.Burgess (1957)

REED, L.J. and MUENCH, H. : A method for estimating fifty percent and points. Am.Jl.Hyg. (1938) 27, 493-497.

REICH, E. ; FRANKLIN, R.M. ; SHATKIN, A.J. and TATUM, E.L. : Effects of actinomycine D on cellular nucleic acid synthesis and virus production. Science (1961) 134, 556-557.

RICH, M. ; BOLAFFI, J. ; KNOLL, J., CHEONG, L. and EIDINOFF, M.L. : Growth inhibition of a human tumor cell strain by 5 fluorouracil, 5 fluorouridine and 5 fluoro-2' deoxyuridine reversal studies. Canc.Res. (1958) 18, 730.

RICH, M.A., SASLAW, L. and EIDINOFF, M.L. : Some differences among various mammalian cell lines in reversal of growth inhibition by 5 fluorouracil. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. (1960) 103, 791-796.

RICH, M.A., STONEHILL, E.A. and EIDINOFF, M.L. : Growth inhibition of chick embryo cells by some 5 fluorinated pyrimidines : effect on Rous sarcoma virus infection. Jl.Nat.Canc.Inst. (1960) 25, 1355.

RICH, M.A., PEREZ, A. and EIDINOFF, M.L. : Effect of 5 fluorodeoxyuridine on the proliferation of Rous sarcoma virus. Virology (1962) 16, 1-8.

ROTHSTEIN, E.L. and MANSON, L.A. : Phosphorus incorporation into high molecular weight RNA of poliovirus-infected Hela cells. Virology (1959) 9, 141-142.

ROSE, H.H. and MORGAN, C.: Fine structure of virus infected cells. Ann.Rev.of Microb. (1960) 14, 217-241.

ROUS, P.: A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. Jl.Exp.Med. (1911) 13, 397-411.

ROUS, P. and MURPHY, J.B.: Tumor implantation in the developing embryo experiments with a transmissible sarcoma of the fowl. Jl.Am.Med.Asso (1911) 56, 741.

ROUS, P. : Resistance to a tumor producing agent as distinct from resistance to the implanted tumors cells. Jl.Exp.Med. (1913) 18, 416-427.

ROUS, P. and MURPHY, J.B. : On the causation by filterable agents of three distinct chicken tumors. Jl.Exp.Med. (1914a) 19, 52-69.

ROUS, P. and MURPHY, J.B. : On immunity to transplantable chicken tumors Jl.Exp.Med. (1914b) 20, 419-432.

ROUS, P. and BEARD, J.W. : Progression to carcinoma of virus induced rabbit papillomas (Shope) Jl.Exp.Med. (1935) 62, 523-548.

ROUS, P. : The virus tumors and the tumor problem. Am.Jl.Canc. (1936) 28, 233-272;

ROUS, P. : The nearer causes of cancer. J.A.M.A. (1943) 122, 573-581.

RUBIN, H. : Quantitative relations between causative virus and cells in the Rous N° I chicken sarcoma. Virology (1955) I, 445-473.

RUBIN, H. : An analysis of the apparent neutralization of Rous sarcoma virus with antiserum to normal chick tissues. Virology (1956) 2, 545

RUBIN, H. : The production of virus by Rous sarcoma cells. Ann.N.Y.Acad.Sci. (1957) 68, 459-472.

RUBIN, H., FRANKLIN, R.M. and BALUDA, M. : Infection and growth of Newcastle disease virus (NDV) in cultures of chick embryo lung epithelium. Virology (1957) 3, 587-600.

RUBIN, H. and TEMIN, H.M. : Infection with the Rous sarcoma virus in vitro Fed.Proc. (1958) 17, 994.

RUBIN, H. : An analysis of the assay of Rous sarcoma cells in vitro by the infective center technique. Virology (1960a) 10, 29-49.

RUBIN, H. : Growth of Rous sarcoma virus in chick embryo cells following irradiation of host cells or free virus. Virology (1960b) II, 28-47.

RUBIN, H. : The suppression of morphological alterations in cells infected with Rous sarcoma virus. Virology (1960c) 12, 14-31.

RUBIN, H.: A virus in chick embryos wich induces resistance in vitro to infection with Rous sarcoma virus. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. (1960d) 46, 1105-1119.

RUBIN, H. : The nature of a virus induced cellular resistance to Rous sarcoma virus. Virology (1961) 13, 200-207.

SALZMAN, N.P. : Systematic fluctuations in the cellular protein RNA and DNA during growth of mammalian cell culture. Biochim. et Biophy.Acta (1959) 31, 158-163.

SALZMAN, N.P. ; LOCKART, R.Z. and SEBRING, E.D.: Alterations in Hela cell metabolism resulting from poliovirus infection. Virology (1959) 9, 244-259.

SALZMAN, N.P. and SEBRING, E.D.: Utilization of precursors for nucleic acid synthesis by human cell cultures.Arch.Biochem.Biophy. (1959) 84, 143-150.

SALZMAN, N.P. : Formation of vaccinia deoxyribonucleic acid and vaccinia virus. Virology (1960) 10, 150-152.

SANARELLI, G. Das myxomatogene virus Beitrag zum Studium der Krankheit serieger ausserhalb des Sichtbaren. Centralb.F.Bakt. (1958) 23, 865.

SANDERS, F.K., HUPPERT, J. and HOSKINS, JM. : Replication of an animal virus Symposia Soc.Exp.Biol. (1958) 12, 123.

SANDERS, F.K.: Role of infective nucleic acid on the production of E.M.C. Nature (1960) 185, 802.

SANFORD, K.K., LIKELY, G.D., BRYAN, W.R. and EARLE, W.R. : The infection of cells in tissue culture with Rous sarcoma virus. Jl.Nat.Canc.Inst. (1952) 12, 1317.

SHAVER, D.N., BARRON, A.L. and KARZON, D.T. : Cytopathology of human Enteric viruses in tissue culture. Am.Jl.Path. (1958) 33,943.

SHOPE, R.E. : A transmissible tumor like condition in rabbits. Jl.Exp.Med. (1932) 56, 793.

SHOPE, R.E. : A filterable virus causing a tumor like condition in rabbits and its relationschip to virus myxomatosum. Jl.Exp.Med. (1932) 56, 803.

SHOPE, R.E. : Infectious papillomatosis of rabbits. Jl.Exp.Med. (1933) 58, 607.

SIMINOVITCH, L., GRAHAM, A.F. ; LESLEY, S.M. and NEVILL, A.: Propagation of L strain mouse cells in suspension. Exp.Cell.Res. (1957) 12, 299-308.

SIMON, E.H.: Evidence for the nonparticipation of DNA in viral RNA synthesis. Virology (1961) 13, 105-118.

STEWARD, S.E., EDDY, D.E., GOGHENOUR, A.M., BORGESES, N.G. and GRUBBS, G.E. : The induction of neoplasms with a substance released from mouse tumor by tissue culture. Virology (1957) 3, 380-400.

SVOBODA, J. and GROZDANOVIC, I.: Heterotransplantation of Rous sarcoma in young rats. Folia Biol. (1959) 5, 40-46.

SVOBODA, J.: Analysis of acquired tolerance to the Rous sarcoma virus in ducks. II/The adoptive period, heteroagglutinin formation and transfer of tumors brown in tolerant birds. Folia Biol. (1960) 6, 21-26.

TANAMI, Y., POLLARD, M. and STARRT. : Replication pattern of psittacosis virus in a tissue culture system (1961). Virology 15, 22-29.

TEMIN, H.M. and RUBIN, H. : Characteristics of an assay for Rous sarcoma virus and Rous sarcoma cells in tissue culture. Virology (1958) 6, 669

TEMIN, H.M. and RUBIN, H. : A kinetic study of infection of chick embryo cells in vitro by Rous sarcoma virus. Virology (1959) 8, 209-222.

TEMIN, H.M. : The control of cellular morphology in embryonic cells infected with Rous sarcoma virus in viro. Virology (1960) 10, 182-197.

TEMIN, H.M. : Mixed infection with two types of Rous sarcoma virus. Virology (1961) 13, 158.

TENENBAUM, E. : A pure strain of Rous sarcoma cells.Brit.Jl.Exp.Path. (1943) 24, 56.

TENENBAUM, E. and DOLJANSKI, L. : Studies on Rous sarcoma cells cultivated in vitro. II/Morphology properties of Rous sarcoma cells. Canc.Res. (1943) 3, 584.

TOMASZ, A. and BOREK, E. : The mechanism of bacterial fragility produced by 5 fluorouracil the accumulation of cell wall precursors. Proceed. Nat.Acad. Sci. (1960) 46, 324-402.

VIGIER, P. : Reliability of titration or Rous sarcoma virus by the count of the pocks production on the eggs chorio-allantoïc membrane. Virology (1959) 8, 40-79.

VIGIER, P. et GOLDÉ A. : Growth curve of Rous sarcoma virus on chick embryo cells in vitro (1959) Virology. 8, 60-79.

VIGIER, P. et GOLDÉ, A.: Recherches sur le virus du sarcome de Rous passé en série dans l'oeuf. Ann.Inst.Past. (1961) 100, 200-213.

VOGT, M. and DULBECCO, R.: Virus cell interaction with a tumor producing virus. Proceed.Nat.Acad.Sci. (1960) 46, 365-370.

VOGT, M. and DULBECCO, R. : Studies on cells rendered neoplastic by polyoma virus. The problem of the presence of virus related materials(1962) Virology 16, 41-51.

VOGT, P.K. and RUBIN, H. : Localisation of infectious virus and viral antigen in chick fibroblasts during successive stages of infection with Rous sarcoma virus. Virology (1961) 13, 528-544.

WALKER, D.L. : In vitro cell-virus relationships resulting in cell death. Ann. Rev.Micro. (1960) 14, 177-196.

WATERS, N.F. : Natural transmission of avian lymphomatosis. Poultry Sci. (1945) 24, 286.

WATERS, N.F. : Mortality from lymphamotosis and other causes among inbred lines of white leghorns.Poultry Science (1951) 30, 531-545.

WATERS, N.F. and BURMESTER, B.R. : Mode of inheritance of resistance to Rous sarcoma virus in chickens. Jl.Nat.Canc.Inst. (1961) 27, 655-664.

WEIL, R., BENDICH, A. and SOUTHAM, M.: Attempts to extract infective nucleic acid of Rous sarcoma virus. Jl.Exp.Biol.a.Med. (1960) 104, 670.

WEISS,: Cytochemical observations on chicken monocytes macrophages and giant cells in tissue culture. Jl.Histo.and Cyto. (1953) 1, 47.

WHEELOCK, F.E. and TAMM, I.: Biocheminal basis for alterations in structure and function of Hela cells infected with N D V Jl.Exp.Med. (1961) 114, 617-632.

WHITFIELD, J.F. and RIXON, R.H.: Effects of x-radiation on multiplication and nucleic acid synthesis in culture of L strain mouse cells. Exp.Cell.Res. (1959) 18, 126-137.

WINOCOUR, E. and SACHS : Cell virus interaction with the polyoma virus I/Studies on the lytic interaction in the mouse embryo system. Virology (1960) II, 699.

WOLL, E. : The Rous chicken sarcoma in birds treated with folic acid and its derivatives : a pathological study. Trans.N.Y.Acad.Sci. (1948) 10,83.

ZAMENHOFF, S., REINER, B., DE GIOVANNI, R. and RICH, K. : Introduction of unnatural pyrimidines into deoxyribonucleic acid of E.Coli. J.B.C. (1956) 219, 167-173.

ZILBER, L.A. et KRYUKOVA, I.N. : Maladie hemorragique du rat causée par le virus de sarcome de poule. Voprossi virus oligû (1957) 4, 239.

ZIMMERMANN, T. and SCHÄFER, W.: Effect of p-fluorophenylalanine on fowl plague virus multiplication. Virology (1960) II, 676-698.

ZWEIBAUM, J. : Recherches cytologiques sur les cellules du sarcome de Rous cultivées in vitro. Jl.Arch.Exp.Zellforsch (1933) 14, 358.

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION 1

HISTORIQUE DU VIRUS DE ROUS 6

CHAPITRE I

METHODES EXPERIMENTALES

- Cultures cellulaires 20

- Méthodes de titrage
  - Chez l'animal 25
  - Dans les oeufs embryonnés 26
  - Sur des cultures de fibroblastes d'embryons de poule 30

- Préparation des suspensions virales
  - Matériel brut utilisé 35
  - Purification des suspensions de virus brut 39

CHAPITRE II

MULTIPLICATION DES CELLULES ET DU VIRUS DE ROUS DANS DES CULTURES PRIMAIRES CONFLUENTES

A - Etude cinétique 41

- Introduction 41
- Matériel et méthodes 43
- Conditions expérimentales 44
- Résultats :
  - Adsorption du virus 48
  - Multiplication du virus et des cellules 50
  - le rendement en virus par cellule 57

- Interprétation des résultats 60

B - Etude quantitative des altérations morphologiques cellulaires provoquées par le virus de Rous. 66

- Introduction 66
- Méthodes expérimentales 68
- Résultats 70
- Interprétation des résultats 77

CHAPITRE III

MULTIPLICATION DES CELLULES ET DU VIRUS DANS DES CULTURES SECONDAIRES NON CONFLUENTES

- Introduction 83

- Matériel et méthodes 84

- Expériences
  - Adsorption du virus 86
  - Multiplication du virus après différentes multiplicités d'infection 88
  - Durée de la période d'éclipse 92
  - Le problème des centres infectieux 99
  - Multiplication des cellules 102

- Discussion 105

CHAPITRE IV

ACTION DES INHIBITEURS DE LA SYNTHESE DES ACIDES NUCLEIQUES ET DES PROTEINES SUR LA MULTIPLICATION DES CELLULES ET DU VIRUS

I - Action du Fluoro-Uracile FU et de la Fluoro-desoxyuridine FUDR sur la synthèse des acides nucléiques 111

I. Introduction 111
II. Matériel et méthodes 114
III. Expériences 115

A - Action de doses croissantes de FU et FUDR ajoutées au moment de l'infection 116

1. Action de FU
   a) Sur la multiplication des cellules 116
   b) Sur la production virale 119
   c) Sur le nombre des centres infectieux 121

2. Action de FUDR
a) Sur la multiplication des cellules 122
b) Sur la production virale 125

B - Inhibition de la production virale par une dose de 20 ug/ml de FU ajouté à divers moments du cycle de multiplication du virus. 125

1. Action de FU ajouté durant la période d'éclipse sur la production du virus 1 jour, 2 jours et 3 jours après l'infection 125

2. Action de FU ajouté au-delà de l'éclipse sur la production du virus pendant 1 semaine 130

C - Action de durée de contact limitées de FU (20 ug/ml) sur la multiplication des cellules et du virus 137

1. Durées de contact limitées de FU pendant la période d'éclipse du virus..... 139

a) Action sur la multiplication cellulaire 139
b) Action sur la production virale 142

D - Etude de la réversibilité d'action de FU sur la multiplication des cellules et du virus, par l'uracile et la thymidine 148

1. Addition simultanée de FU et des deux bases pyrimidiques dès l'infection..... 149

a) Action sur la multiplication des cellules.... 149
b) Action sur la multiplication des virus 149

2. Addition d'uracile et de thymidine après l'élimination de FU 152

a) Action sur la multiplication des cellules.... 152
b) action sur la multiplication du virus 153

IV - Discussion
- Action des dérivés étudiés sur la multiplication des cellules 158
- Action des dérivés étudiés sur la multiplication du virus. Spécificité d'action de FU.
- Cinétique de la synthèse du matériel viral.

II - ACTION DE LA FLUORO-PHENYLALANINE (FPA) sur LA SYNTHESE DES PROTEINES 170

Introduction 170

- 1. Expériences 171
a) Action de doses croissantes de FPA sur la multiplication des cellules et du virus... 171

b) Action de la FPA (50 ug) ajoutées à divers moments de la période d'éclipse 173

c) Action de la FPA ajoutée 1 jour, 2 jours, et 3 jours après l'infection sur la production d'une semaine. 173

- 2. Discussion 175

CHAPITRE V

MODIFICATIONS QUANTITATIVES DES ACIDES NUCLEIQUES ET DES PROTEINES PROVOQUEES DANS LES CELLULES PAR LE VIRUS DE ROUS

I - Introduction 181

II - Matériel et méthodes 183

III - Résultats 186
1. Cellules non infectées 186
2. Cellules infectées 191

a) Modification du volume cellulaire 193
b) Modification chimiques 194

- Discussion 196
1) Cellules non infectées 196
2) Cellules infectées 199

CHAPITRE VI

Discussion 205
Résumé et conclusions 215

BIBLIOGRAPHIE 221

TABLE DES MATIERES 239

Deuxième THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

"L'INTERFERON"

Vu et approuvé
Paris, le 4 Juin 1962

Le Doyen de la Faculté des Sciences,
Marc ZAMANSKY

Vu
et permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris,
Jean ROCHE